

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko.

Monika Julita Adamczyk-Popławska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

- Stopień doktora nauk biologicznych (*Biologie cellulaire et moléculaire*) nadany przez Uniwersytet Ludwika Pasteura (aktualnie Uniwersytet Strasburski) w dniu 4 września 1998, Strasburg, Francja. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Effet des oxystérols sur le glioblastome induit dans le système nerveux du rat: effet antiproliférant, antitumoral et mécanisme d'action*” - [Wpływ oksysteroli na rozwój glejaka wielopostaciowego zaindukowanego u szczura: efekt antyproliferacyjny, antynowotworowy oraz mechanizm działania]. Promotorem w przewodzie doktorskim był **dr Marcel Mersel** (DR2, Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires (LNMIC), UPR 416, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Strasburg, Francja, a recenzentami **prof. Pierre Benveniste** (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasburg, Francja), **dr André Ulmann** (HRA-Pharma, Paryż, Francja) oraz **prof. Jean-Claude Horvat** (Laboratoire de Neurobiologie, URA CNRS 1448, Université René Descartes, Paryż, Francja) pod przewodnictwem **prof. Guy Vincendon** (LNMIC, UPR 416, CNRS, Strasburg, Francja). Praca została wyróżniona przez recenzentów („*Très honorable avec félicitations*”).
Nostryfikacja dyplomu: 26 października 1999 na Uniwersytecie Warszawskim, Warszawa, Polska
- 5 rok studiów na kierunku Biologia molekularna i komórkowa (DEA: *Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie moléculaire et cellulaire*), specjalizacja neurobiologia - odpowiednik pracy magisterskiej, dyplom uzyskany na Uniwersytecie Ludwika Pasteura (aktualnie Uniwersytet Strasburski), Strasburg, Francja, w sesji 1992 - 1993
Tytuł pracy magisterskiej: „*Effet des oxystérols sur le glioblastome induit dans le cerveau de rat*” - [Działanie oksysteroli względem glejaka wielopostaciowego wywołanego u szczura]. Opiekunem był dr Marcel Mersel (DR2, LNMIC, UPR 416, CNRS, Strasburg, Francja)
- Uzyskanie dyplomu magistra na kierunku Biochemia („*Magistère de Biochimie*”) - dyplom uzyskany po 4 roku studiów na Uniwersytecie Ludwika Pasteura (aktualnie Uniwersytet Strasburski), Strasburg, Francja, w sesji 1991 - 1992
- Uzyskanie dyplomu licencjata na kierunku Biochemia („*Licence de Biochimie*”) - dyplom uzyskany na Uniwersytecie Ludwika Pasteura (aktualnie Uniwersytet Strasburski), Strasburg, Francja, w sesji 1990 - 1991
- Uzyskanie dyplomu studiów ogólnouniwersyteckich DEUG („*Diplôme d'Etudes Universitaires Générales*”) - dyplom uzyskany po 2 roku studiów w dziedzinie

Biologii na Uniwersytecie Ludwika Pasteura (aktualnie Uniwersytet Strasburski),
Strasburg, Francja, w sesji 1989 - 1990

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

- Od 1 października 2012: starszy wykładowca, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii, Zakład Wirusologii, Warszawa
- Grudzień 2000 - wrzesień 2012: adiunkt: Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii, Zakład Wirusologii, Warszawa
- Grudzień 2004 - marzec 2006: urlop macierzyński/wychowawczy
- Wrzesień 1999 - listopad 2000: adiunkt: Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Biochemii, Warszawa
- Październik 1998 - maj 1999: staż post-doc: Uniwersytet Manitoba, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej (Department of Biochemistry and Molecular Biology), Winnipeg, Kanada
- 1997 - 1998: asystent: praca dydaktyczna. Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires - LNMIC (Laboratorium Neurobiologii Molekularnej Oddziaływań Komórkowych), UPR 416, CNRS, Strasburg, Francja.
- 1993 - 1998: **staż doktorski**. LNMIC, UPR 416, CNRS, Strasburg, Francja

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

a) *Tytuł osiągnięcia naukowego*

Zmienne fazowo systemy restrykcji-modyfikacji DNA i ich rola w patogenności bakterii *Neisseria gonorrhoeae*

- b) *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.*
- i. **Adameczyk-Popławska M, Kondrzycka A, Urbanek K, Piekarówic A. 2003. Tetra-amino-acid tandem repeats are involved in HsdS complementation in type IC restriction-modification systems. *Microbiology* 149:3311-3319**

IF₂₀₀₃ – **3,044**; IF_{5-letni} – **3,03**; punkty MNiSW **30**; liczba cytowań (wg bazy WoS) **7**

Wkład habilitanta: **75%**. Planowanie doświadczeń, wykonanie większości doświadczeń, opieka nad studentami (Kondrzycka A, Urbanek K) podczas wykonywania przez nich badań, które weszły w skład publikacji. Przygotowanie manuskryptu oraz rycin i tabel, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- ii. **Adamczyk-Popławska M**, Lower M, Piekarowicz A. 2009. Characterization of the NgoAXP: phase-variable type III restriction-modification system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiology Letters* 300(1):25-35

IF₂₀₀₉ – **2,199**; IF_{5-letni} – **2,17**; punkty MNiSW **20**; liczba cytowań (wg bazy WoS) **7**

Wkład habilitanta: **60%**. Autor korespondencyjny; współautorstwo koncepcji badań, planowanie doświadczeń, wykonanie części doświadczeń, opieka nad studentem (Lower M) podczas wykonywania przez niego badań, które weszły w skład publikacji. Przygotowanie manuskryptu oraz rycin i tabel, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iii. **Adamczyk-Popławska M**, Lower M, Piekarowicz A. 2011. Deletion of one nucleotide within the homonucleotide tract present in the hsdS gene alters the DNA sequence specificity of type I restriction-modification system NgoAV. *Journal of Bacteriology* 193(23):6750-6759

IF₂₀₁₁ – **3,825**; IF_{5-letni} – **3,11**; punkty MNiSW **30**; liczba cytowań (wg bazy WoS) **4**

Wkład habilitanta: **70%**. Autor korespondencyjny, współautorstwo koncepcji badań, planowanie doświadczeń, wykonanie części doświadczeń, opieka nad studentem (Lower M) podczas wykonywania przez niego badań, które weszły w skład publikacji. Przygotowanie manuskryptu oraz rycin i tabel, odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iv. Kwiatek A, Bacal P, Wasiluk A, Trybunko A, **Adamczyk-Popławska M**. 2014. The dam replacing gene product enhances *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 viability and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology* 5:712

IF₂₀₁₅ – **3,989**; IF_{5-letni} – **4,17**; punkty MNiSW **35**; liczba cytowań (wg bazy WoS) **2**

Wkład habilitanta: **70%**. Autor korespondencyjny, autorstwo koncepcji badań, zaplanowanie doświadczeń, pozyskanie finansowania badań (grant numer NN303816940), wykonanie części doświadczeń, opieka nad studentami (Wasiluk A, Trybunko A) podczas wykonywania przez nich badań, które weszły w skład publikacji. Analiza wyników mikromacierzy oraz zdeponowanie danych mikromacierzy ekspresyjnych w międzynarodowej bazie danych GEO (NCBI), przygotowanie manuskryptu oraz rycin i tabel, korespondencja z recenzentami.

- v. Kwiatek A, Mrozek A, Bacal P, Piekarowicz A, **Adamczyk-Popławska M**. 2015. Type III methyltransferase M.NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 regulates biofilm formation and interactions with human cells. *Frontiers in Microbiology* 6:1426

IF₂₀₁₅ – **3,989**; IF_{5-letni} – **4,17**; punkty MNiSW **35**; liczba cytowań (wg bazy WoS) **0**

Wkład habilitanta: **70%**. Autor korespondencyjny, współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie doświadczeń, pozyskanie finansowania badań (grant numer

NN303816940), wykonanie części doświadczeń, opieka nad studentką (Mrozek A) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji. Analiza wyników mikromacierzy ekspresyjnych oraz zdeponowanie danych z mikromacierzy w międzynarodowej bazie danych GEO (NCBI). Przygotowanie manuskryptu oraz rycin i tabel, korespondencja z recenzentami.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z 2015 wykorzystano ostatnio dostępną wartość IF₂₀₁₄) - **17,046**
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - **150**
- Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) - **20**

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

„ZMIENNE FAZOWO SYSTEMY RESTRYKCJI-MODYFIKACJI DNA I ICH ROLA W PATOGENNOŚCI BAKTERII *NEISSERIA GONORRHOEAE*”

WSTĘP

Systemy restrykcji-modyfikacji (RM) DNA zostały odkryte u *Escherichia coli* w połowie XX wieku (Bertani & Weigle, 1953; Luria & Human, 1952). Dotychczas obecność tych systemów wykazano wyłącznie u organizmów prokariotycznych - bakterii i archeonów oraz u bakteriofagów (Bickle, 2004; Murray, 2000). Występowanie systemów RM odnotowano także u wirusów atakujących jednokomórkowe algi z rodzaju *Chlorella* (Xia *et al.*, 1986a; Xia *et al.*, 1986b).

Systemy RM, poza nielicznymi wyjątkami, składają się z dwóch aktywności katalitycznych: endonukleolitycznej i modyfikacyjnej (metylującej). Metylotransferazy DNA katalizują przeniesienie grupy metylowej na adeninę (w pozycji N6) lub na cytozynę (w pozycjach N4 lub C5). Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (AdoMet). Enzymy zwane endonukleazami restrykcyjnymi odpowiedzialne są za hydrolizę wiązań fosfodiesterowych w DNA, pomiędzy cukrem, a fosforanem. Zarówno metylotransferaza, jak i endonukleaza restrykcyjna, należące do jednego systemu RM, rozpoznają tę samą, specyficzną, sekwencję nukleotydową w dwuniciowym DNA. W klasycznych systemach RM, endonukleazy restrykcyjne przecinają dwie nici DNA, jeżeli nie jest on zmodyfikowany przez towarzyszącą metylotransferazę (Bickle, 2004; Roberts *et al.*, 2003; Vasu & Nagaraja, 2013).

W oparciu o różnice w budowie i organizacji systemów RM, w sposobie cięcia, a także wymagania tych systemów względem kofaktorów reakcji, systemy RM zostały podzielone na 4 Typy (Roberts *et al.*, 2003). Systemy Typu I kodowane są przez trzy geny: *hsdS*, *hsdM* i *hsdR*. Osobno, żaden z produktów tych genów nie ma aktywności

enzymatycznej. Podjednostki HsdM i HsdS tworzą aktywną katalitycznie metylotransferazę, a ich kombinacja z podjednostką HsdR enzym o aktywności endonukleolitycznej i metylacyjnej. W przypadku systemów RM Typu I obie reakcje, metylacji i hydrolizy wiązań w DNA, wymagają obecności ATP. Cięcie następuje po translokacji DNA przez kompleks enzymatyczny w przypadkowym miejscu, odległym od rozpoznawanej sekwencji. Specyficzność systemów Typu I jest determinowana przez podjednostkę HsdS. Systemy RM Typu II są najprostsze jeżeli chodzi o organizację, ponieważ składają się, z nielicznymi wyjątkami, z dwóch strukturalnie i funkcjonalnie niezależnych enzymów: endonukleazy restrykcyjnej i metylotransferazy. Oba enzymy rozpoznają tę samą sekwencję w DNA, a cięcie następuje w ściśle określonym miejscu, zazwyczaj w obrębie rozpoznawanej sekwencji lub tuż poza nią (ale istnieją liczne wyjątki od tej reguły). Systemy RM Typu III składają się tylko z dwóch białek, ale aktywność endonukleazy restrykcyjnej uzyskana jest dzięki formowaniu kompleksu pomiędzy produktem genu *res*, a podjednostką Mod o aktywności metylotransferazy (kodowanej przez gen *mod*). Do Typu IV zaklasyfikowano natomiast różne niestandardowe enzymy. Endonukleazy restrykcyjne Typu IV rozpoznają i tną w zmodyfikowanych sekwencjach DNA tzn. metylowanych, hydroksymetylowanych lub glukosyl-hydroksymetylowanych (Roberts *et al.*, 2003). Systemy Typu II, a szczególnie endonukleazy zostały dość gruntownie przebadane ze względu na ich szerokie zastosowanie w biologii molekularnej i biotechnologii (Roberts *et al.*, 2003). Systemy RM Typu III są najmniej liczne i jak dotąd scharakteryzowano zaledwie kilkunastu jego przedstawicieli (Rao *et al.*, 2014; Williams, 2003). Za główną funkcję metylotransferaz DNA, będących częścią systemów RM uważa się znakowanie DNA, dzięki któremu własny materiał genetyczny jest chroniony przed degradacją przez aktywne endonukleazy restrykcyjne. Niszczony jest za to obcy DNA, np. bakteriofagowy (Vasu & Nagaraja, 2013). Oprócz udziału w funkcji obronnej komórki przed inwazją fagów lub innym obcym DNA, dla metylacji DNA u organizmów pro- i eukariotycznych postulowana jest także dodatkowa rola jako znacznika epigenetycznego, zwiększającego informacje zawarte w sekwencji DNA (Fox *et al.*, 2007; Srikhanta *et al.*, 2009; Srikhanta *et al.*, 2010; Srikhanta *et al.*, 2011). U organizmów wyższych, np. człowieka zaburzenia epigenetyczne mogą skutkować nieprawidłowym funkcjonowaniem organizmu i powstaniem wielu chorób (Girardot *et al.*, 2013). U prokariota wykazano, że metylacja DNA, poprzez samotne metylotransferazy typu Dam, reguluje, między innymi, ekspresję genów, inicjację replikacji DNA oraz postreplikacyjną naprawę DNA (Low *et al.*, 2001). Przez długi okres czasu, metylotransferazom będącym częścią systemów RM przypisywano rolę wyłącznie ochronną. Wyniki badań sugerują, że ekspresja genów kodujących systemy RM może ulegać zmienności fazowej. Zmiana wzoru metylacji mogłaby rzutować na modulację poziomu ekspresji określonych genów, a to z kolei przekładałoby się na zmiany w fenotypie bakterii (Fox *et al.*, 2007; Srikhanta *et al.*, 2010; Srikhanta *et al.*, 2011). W roku 2005 Srikhanta i wsp. (Srikhanta *et al.*, 2005) zaproponowali koncept tzw. „*phasevarion*”, który zdefiniowali jako grupę genów wspólnie regulowanych przez zmienne fazowo metylotransferazy DNA należące do systemów RM. Zmienność fazowa to proces odwracalnego przełączania (włączania i wyłączania) ekspresji genów (De Bolle *et al.*, 2000). Dzięki zmienności fazowej komórki bakteryjne mogą zmieniać, w sposób odwracalny, swój fenotyp. Prowadzi to do różnorodności fizjologicznej w obrębie jednej populacji bakterii i dzięki temu zwiększa się potencjał adaptacyjny tej populacji do różnych warunków środowiskowych (Foley, 2015; Salaün *et al.*, 2003). Zjawisko zmienności fazowej dotyczy zarówno ekspresji genów kodujących białka powierzchniowe, jak i tych kodujących białka

wewnątrzkomórkowe. Mechanizm zmienności ekspresji genów może być powiązany ze zmianami w sekwencji DNA, rekombinacją, ale także ze znakowaniem epigenetycznym, w którym uczestniczą metylotransferazy DNA. Zmienność wydaje się być procesem losowym, jednakże nie można wykluczyć jej modulacji poprzez czynniki zewnętrzne i warunki środowiskowe, a także działania presji selekcyjnej (van der Woude & Bäumlner, 2004; van der Woude, 2006). Zmienność fazowa jest bardzo intensywnie badana w wielu gatunkach bakterii patogennych np. *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella haemolytica* i *Moraxella catarrhalis*. Jednakże zjawisko to zaobserwowano także wśród bakterii niepatogennych, jak np. komensalnych przedstawicieli rodzaju *Neisseria* (De Bolle *et al.*, 2000; Foley, 2015; Salaün *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 2001; van der Woude & Bäumlner, 2004).

Bakterie *N. gonorrhoeae* (gonokoki) cechuje niezwykła zmienność antygenowa, która wyraża się zmiennością w ekspresji białek powierzchniowych, np. białek błonowych, fimbrii oraz lipopolisacharydów. Jest to związane z unikaniem działania układu odpornościowego człowieka (Cohen & Sparling, 1992; Gray-Owen *et al.*, 1997). Gonokoki to gram ujemne ziarniaki, które są czynnikiem etiologicznym rzeżączki, choroby przenoszonej drogą płciową. Infekcje gonokokowe dotyczą układu płciowo-moczowego zarówno kobiet jak i mężczyzn. U kobiet, infekcja pierwotna zaczyna się głównie od komórek endometrium szyjki macicy, a u mężczyzn, od komórek cewki moczowej. Zdolność opanowania dwóch zupełnie różnych nisz ekologicznych, sugeruje ogromny potencjał adaptacyjny gonokoków (Cohen & Sparling, 1992). Nielezione lub nieefektywnie leczone infekcje doprowadzają do rozprzestrzenienia się bakterii na cały układ moczowo-płciowy a nawet na inne, odległe, organy np. stawy lub serce (Holmes, 1999). Infekcja może skutkować zapaleniem opon mózgowych lub innymi komplikacjami. *N. gonorrhoeae* przenosi się także z zainfekowanych matek na noworodki i może doprowadzić do ślepoty. Wykazano, że infekcja dwóinką rzeżączki zwiększa ryzyko infekcji wirusem HIV (Jarvis & Chang, 2012). Dane literaturowe wskazują na około 88 milionów przypadków zakażeń gonokokami rocznie. W roku 2012, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) ogłosiła alarm związany z pojawieniem się szczepów *N. gonorrhoeae* opornych nawet na cefalosporyny, które do tej pory wydawały się lekiem ostatniej szansy w leczeniu infekcji gonokokowych. Naukowcy i lekarze zobowiązani zostali do opracowania nowych metod zwalczania *Neisseria*. Poznanie biologii tego mikroorganizmu, jego mechanizmu patogenności, infekcyjności i inwazyjności jest pierwszym krokiem do opracowania nowych, skutecznych metod zwalczania infekcji gonokokowej oraz zapobiegania im.

Celem mojej pracy było zbadanie powiązania fenotypowej zmienności *N. gonorrhoeae* oraz jej potencjału adaptacyjnego do różnych środowisk, z licznymi występującymi u gonokoków systemami RM DNA. Jako organizm modelowy wybrałam szczep *N. gonorrhoeae* FA1090, który koduje aż 16 systemów RM, w tym dwa typu I, dwa typu III oraz kilkanaście typu II (Stein *et al.*, 1995). W momencie rozpoczęcia przeze mnie zaplanowanych badań nie było żadnych danych literaturowych dotyczących systemów RM Typu III u *N. gonorrhoeae* i tylko jedna praca wstępnie opisująca jeden z systemów Typu I.

Wyniki badań, które stanowią podstawę przedstawionej rozprawy habilitacyjnej podzieliłam na dwa etapy:

- Charakteryzację nieznanymi systemów RM, które mogłyby ulegać zmienności fazowej
- Analizę wpływu zmienności fazowej systemów RM na patogenność bakterii *N. gonorrhoeae*

CHARAKTERYSTYKA ZMIENNYCH FAZOWO SYSTEMÓW RESTRYKCJI-MODYFIKACJI DNA KODOWANYCH PRZEZ *NEISSERIA GONORRHOEAE* FA1090

PUBLIKACJE HABILITANTA W/W TEMACIE

Adamczyk-Popławska M, Kondrzycka A, Urbanek K, Piekarowicz A. 2003. Tetra-amino-acid tandem repeats are involved in HsdS complementation in type IC restriction-modification systems. *Microbiology* 149:3311-3319

Adamczyk-Popławska M, Lower M, Piekarowicz A. 2009. Characterization of the NgoAXP: phase-variable type III restriction-modification system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett.* 300(1):25-35

Adamczyk-Popławska M, Lower M, Piekarowicz A. 2011. Deletion of one nucleotide within the homonucleotide tract present in the *hsdS* gene alters the DNA sequence specificity of type I restriction-modification system NgoAV. *J Bacteriol.* 193(23):6750-6759

Początkowe badania dotyczyły systemu NgoAV, należącego do Typu I systemów RM i rozpoznającego *quasi* palindromiczną w sekwencję DNA: GCAN₈TGC (Piekarowicz *et al.*, 2001). Systemy RM Typu I podzielone są na kilka podrodzin od IA do IE. Podział ten oparty jest na homologii sekwencji aminokwasowej poszczególnych podjednostek, kolejności genów kodujących podjednostki, lokalizacji genów na chromosomie lub plazmidzie, możliwości hybrydyzacji DNA kodującego systemy, ale przede wszystkim na komplementacji podjednostek (Gubler *et al.*, 1992; Murray, 2000). Komplementacja podjednostek polega na możliwości ich wymiany pomiędzy systemami należącymi do tego samego podtypu bez utraty aktywności enzymatycznej. Takie badania przeprowadzono np. dla archetypów systemu Typu IC: EcoR124I/II i EcoDXXI. Wymiana podjednostek HsdS pomiędzy tymi systemami pozwoliła na uzyskanie aktywności modyfikacyjnej i restrykcyjnej hybrydowych kompleksów enzymatycznych ze specyficznością zależną od użytej podjednostki HsdS (Gubler *et al.*, 1992).

Podjednostka HsdS z systemu RM NgoAV wykazywała największe podobieństwo sekwencji aminokwasowej do wspomnianych wyżej podjednostek HsdS z systemów EcoR124I/II i EcoDXXI Typu IC (Piekarowicz *et al.*, 2001). Jednakże żaden z testowanych przez mnie wariantów komplementacji, nie wykazywał aktywności metylacyjnej lub endonukleolitycznej. Reasumując, pomimo homologii, podjednostki należące do archetypów systemu RM Typu IC z *E. coli* nie komplementowały z podjednostkami systemu NgoAV.

Badając system EcoR124I/II, Kneale wykazał, że za oddziaływania pomiędzy podjednostkami tworzącymi jeden system RM oraz za rozpoznawanie specyficznej sekwencji DNA odpowiedzialna jest podjednostka HsdS (Kneale, 1994). W podjednostce HsdS_{EcoR124I/II} wyodrębniono 5 domen: dwie domeny TRD (ang. *target recognition domain*), wysoce zmienne i rozpoznające specyficzne sekwencje w DNA oraz trzy domeny CD (ang. *conserved domain*), domeny konserwowane odpowiedzialne za prawidłową konformację podjednostki HsdS. Przeprowadzona przeze mnie szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej podjednostki HsdS_{NgoAV} pozwoliła na identyfikację w jej w centralnej domenie CD motywu aminokwasowego LEATLEATLEAE, natomiast w podjednostkach HsdS_{EcoR124I/II} i HsdS_{EcoDXXI} motywu TAEL, który był powtórzony dwu- lub trzykrotnie. Analizując sekwencje aminokwasowe innych niescharakteryzowanych eksperymentalnie podjednostek HsdS, których sekwencje zdeponowane były w bazie danych NCBI, wykazałam, że analogiczne powtórzone czteroaminokwasowe motywy znajdują się w domenach CD wielu innych systemów RM typu IC. Motywy te miały różne sekwencje aminokwasowe w zależności od gatunku bakterii, który je kodował. np. SAEL u *Mycoplasma pneumoniae*, TSEL u *Haemophilus influenzae*, TELN u *Helicobacter pylori* lub EAEL u *Xylella fastidiosa*. Motyw SAEL jest powielony aż 15 razy w podjednostce MpnORFGP. Natomiast w potencjalnym systemie Typu IC u *Lactobacillus lactis* powtórzony motyw w ogóle nie występuje.

Powyższe obserwacje zasugerowały istnienie podgrup komplementacyjnych w obrębie rodziny Typu IC. Uzyskałam warianty systemu RM NgoAV z usuniętą sekwencją LEATLEATLEAE oraz hybrydy z podstawioną, zamiast tego motywu, sekwencją TAELTAELTAEL z HsdS_{EcoR124II}. Badania wykazały, że zamiana motywu LEAT na TAEL nie powoduje utraty aktywności systemu, ani nie zmienia specyficzności systemu RM NgoAV. Natomiast usunięcie motywu LEAT skutkuje utratą aktywności podjednostki HsdS_{NgoAV}. Okazało się więc, że komplementacja podjednostek pomiędzy archetypami Typu IC a podjednostką HsdS_{NgoAV} jest możliwa, a kluczem jest obecność „właściwego” motywu w domenie CD.

Najważniejszym odkryciem tej pracy było wykazanie związku pomiędzy komplementacją podjednostek HsdS, a konserwowaną domeną, a szczególnie powtórzonym czteroaminokwasowym motywem obecnym w tej domenie.

Podjednostka HsdS_{NgoAV} różni się od podjednostek HsdS kodowanych przez archetypy Typu IC EcoR124I/II lub DXXI nie tylko innym powtórzonym motywem, ale także tym, że jest naturalnie skróconą podjednostką, zbudowaną z 206 aminokwasów, podczas gdy np. podjednostka HsdS_{EcoR124II} zbudowana jest z 408 aminokwasów (Kneale, 1994). Jednakże, analogicznie jak na końcu aminowym podjednostki HsdS_{EcoR124II}, w podjednostce HsdS_{NgoAV} można wyróżnić wcześniej wspomniane dwie domeny CD i jedną TRD. Analiza genomu *N. gonorrhoeae* FA1090 wykazała obecność dwóch potencjalnych genów, *hdsS1* i *hdsS2*, których produkty wykazywałyby podobieństwo do znanych podjednostek HsdS. Jednakże tylko gen *hdsS1* koduje aktywne białko, odpowiedzialne za specyficzność systemu RM NgoAV (Piekarowicz *et al.*, 2001). Wynika to z faktu, że w sekwencji DNA, kodującej gen *hdsS*, znajduje się kodon stop, który przedwcześnie kończy translację. Kodon stop poprzedzony jest traktem złożonym z 7 guanin (polyG) na 3' końcu genu *hdsS1*. *In silico*, delecja jednego nukleotydu (tyminy z kodonu stop lub guaniny z traktu polyG) w sekwencji kodującej białko HsdS_{NgoAV} powoduje zmianę ramki odczytu. W takim przypadku powstaje

jeden, długi gen *hsdS*, kodujący peptyd o długości 406 aminokwasów. Dzięki manipulacjom genetycznym *in vitro*, usunęłam jeden nukleotyd w obrębie genu *hsdS1*, doprowadzając do delecji albo tyminy z kodonu stop albo jednej guaniny z traktu polyG. Powstałe białko HsdS rozpoznaje inną sekwencję DNA. Ustaliłam, że specyficzność systemu NgoAV zmieniła się z GCAN₈TGC na GCAN₇STCA (S = G lub C). Wydłużona podjednostka HsdS zawiera dwie różne domeny TRD, rozpoznające specyficzne sekwencje nukleotydowe w DNA i rozpoznawana sekwencja nie jest już *quasi* palindromiczna.

Trakty nukleotydowe, zbudowane z powtarzających się nukleotydów, jak ten zidentyfikowany w sekwencji genu *hsdS1*, mogą być przyczyną zmienności fazowej poprzez tzw. poślizg polimerazy DNA (ang. *SSM-slipped strand mispairing*) (De Bolle *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2005). Postawiłam hipotezę, że w genie *hsdS1* kodującym HsdS_{NgoAV} dochodzi w sposób naturalny do zmian w liczbie guanin, co skutkuje albo zmianą specyficzności systemu NgoAV i modyfikowaniem innych sekwencji w DNA lub wręcz dochodzi do inaktywacji systemu RM.

W celu potwierdzenia tej hipotezy, opracowałam własną metodę detekcji delecji jednego nukleotydu w trakcie polyG obecnym w genie *hsdS1*. Metoda opierała się na technice PCR (ang. *polymerase chain reaction*), na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z *N. gonorrhoeae* FA1090 amplifikowałam krótki fragment DNA obejmujący trakt polyG. Zastosowanie polimerazy DNA o wysokiej wierności polimeryzacji zapewniło wierne odtworzenie natywnej sekwencji kopiowanego genomowego DNA. Zaprojektowany przeze mnie wektor pozwalał na specyficzną identyfikację produktu PCR zawierającego trakt polyG z genu *hsdS1* zmniejszony o jeden nukleotyd. Zapewniła to reakcja barwna, będąca efektem ekspresji genu *lacZ*, kodującego fragment α β -galaktozydazy, w fuzji translacyjnej z amplifikowanym traktem zawierającym 6 zamiast 7 guanin. Wykonałam 8 równoległych eksperymentów, badając łącznie 5482 kolonie *E. coli*. Uzyskane rezultaty potwierdziły prawidłowość i funkcjonalność zaproponowanej procedury. Zaobserwowałam 5,8 % niebieskich kolonii. Sekwencjonowanie potwierdziło obecność 6 guanin zamiast 7 w trakcie polyG w połowie przypadków. Reszta badanych klonów zawierała inne, jednonukleotydowe delecje w sekwencji nukleotydowej, np. w trakcie polyA, który także znajduje się w genie *hsdS1*. Podsumowując, zmiana specyficzności systemu NgoAV powiązana jest z odwracalnymi zmianami w liczbie guanin w trakcie polyG, obecnym w genie *hsdS1*, który koduje podjednostkę odpowiedzialną za specyficzność systemu RM. Zmiana taka może mieć miejsce w warunkach naturalnych. W populacji bakterii jednocześnie koegzystują komórki zawierające system NgoAV o różnych specyficznościach. Proces ten wydaje się zachodzić samorzutnie, najprawdopodobniej jako skutek poślizgu polimerazy na długich homonukleotydowych traktach (van der Woude & Bäumlér, 2004). W różnych ramkach odczytu kodowana jest informacja o odmiennych wariantach podjednostek warunkujących specyficzność substratową systemu RM NgoAV. Analogiczny efekt fenotypowy, możliwości uzyskiwania różnych aktywności archetypów systemu IC, zademonstrowany był wcześniej metodami inżynierii genetycznej poprzez delecje części genów kodujących podjednostki HsdS (Abadjieva *et al.*, 1993). Jednakże moje badania wykazały, że do znaczącej zmiany fenotypu wystarczy delecja jednego nukleotydu w sekwencji nukleotydowej, która zachodzi samoistnie w komórkach *N. gonorrhoeae*. Sekwencjonowanie genomu *N. gonorrhoeae* FA1090 pozwoliło na identyfikację dwóch genów NGO0545 i NGO0546, których produkty wykazywały podobieństwo do systemów RM Typu III. Systemy RM Typu III zbudowane są

z dwóch podjednostek Mod i Res. Podjednostka Mod odpowiedzialna jest za rozpoznawanie specyficznej sekwencji w DNA oraz za aktywność katalityczną metylotransferazy DNA. Kompleks obu podjednostek Mod i Res tworzy aktywną endonukleazę restrykcyjną. Cięcie dwuniciowego DNA ma miejsce poza rozpoznawaną sekwencją (oddaloną o 25 - 27 nt) i jego pozycja nie jest stała.

Moje badania potwierdziły hipotezę, że geny NGO0545 i NGO0546 kodują odpowiednio podjednostki Mod i Res, tworzące klasyczny system RM Typu III, który nazwano NgoAX. Określiłam sekwencję rozpoznawaną przez metylotransferazę Mod_{NgoAX} - CCAGG. Modyfikowana jest adenina i powstaje hemimetylowany produkt (modyfikowana sekwencja zawiera tylko jedną adeninę). Wszystkie te cechy są charakterystyczne dla metylotransferaz należących do systemów RM Typu III (Dybvig *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2007).

Analiza sekwencji DNA genu NGO0545, kodującego podjednostkę Mod wykazała 12-krotne powtórzenie kierunkowych sekwencji CCAAC, i jednokrotne CCAAG na końcu 5' tego genu. Przewidywania *in silico* wykazały, że delecja lub insercja jednego takiego motywu mogą doprowadzić do zmiany ramki odczytu, czego efektem jest skrócenie produktu genu kodującego Mod i niepowstanie aktywnej metylotransferazy DNA. Postawiłam hipotezę, że analogicznie do systemu RM NgoAV, modulacja liczby powtórzeń w sekwencji genu NGO0545 będzie skutkowała zmianą fenotypu komórek *N. gonorrhoeae* oraz, że zmiany te będą zachodziły w bakteriach spontanicznie.

Poprzednio opracowany system do detekcji liczby guanin w trakcie polyG, obrazujący sytuację fizjologiczną w komórkach *N. gonorrhoeae* nie sprawdził się w przypadku długiej sekwencji nukleotydowej. Badania nad zmiennością fazową ekspresji genu NGO0545 przeprowadziłam więc w układzie heterologicznym w *Escherichia coli*. Wykorzystałam gen reporterowy kodujący białko zielonej fluorescencji (ang. GFP - green fluorescent protein) w fuzji translacyjnej z genem NGO0545 lub test krzyżowy (ang. cross streaking), w którym badałam zdolność komórek *E. coli*, transformowanych wektorem plazmidowym zawierającym system NgoAX, do restrykcji bakteriofaga lambda.

Testy wykazały, że w komórkach *E. coli* dochodzi do zmian w liczbie powtórzonych motywów w obrębie badanego rejonu genu NGO0545. Zmiana liczby powtórzeń skutkuje efektem fenotypowym: wyłączeniem (faza OFF) lub włączeniem (faza ON) aktywności enzymatycznej systemu RM NgoAX. Badania z użyciem bakteriofaga lambda wykazały, że zmiana OFF do ON jest dwa razy częstsza niż ON do OFF. Ta obserwacja sugeruje, że faza ON może być korzystniejsza dla populacji bakterii niż faza OFF. Jest to prawdopodobnie związane z obecnością genu *res* oraz jego produktu podjednostki Res, odpowiedzialnej za cięcie nukleolityczne. Być może, w przypadku obniżenia stężenia podjednostki Mod i obecności podjednostki Res, w komórce dochodzi do sytuacji, gdzie przeważa aktywność endonukleolityczna systemu nad aktywnością modyfikacyjną. Taki stan byłby letalny dla komórek i dlatego też zmiana OFF do ON jest częstsza. Jeśli ta hipoteza jest prawdziwa, to można wnioskować, że zmienność fazowa systemów RM Typu III nie jest zupełnie przypadkowa, lecz ukierunkowana presją selekcyjną, wymuszoną przez endonukleazę restrykcyjną. Podobne „samolubne” zachowanie endonukleaz restrykcyjnych opisano dla Typu II systemów RM (Kobayashi, 2001). Sekwencjonowanie wyizolowanych plazmidowych DNA potwierdziło, że zmiany w aktywności systemu RM powiązane są ze zmianami

w liczbie powtórzeń pięcionukleotydu sekwencji. Jednakże, zaobserwowałam także duże delecje w sekwencji genu *mod*. Podobne obserwacje opisano w literaturze dla drugiego zmiennego fazowo systemu RM Typu III (NgoAXII) kodowanego przez *N. gonorrhoeae* FA1090 (Srikhanta *et al.*, 2009).

Podsumowując, scharakteryzowałam empirycznie nowy system RM Typu III NgoAX. Ponadto dowiodłam, że ekspresja genu kodującego podjednostkę Mod ulega zmienności fazowej, powiązanej z hetero-nukleotydowymi powtórzeniami, co skutkuje modulacją aktywności enzymatycznej systemu RM NgoAX w *E. coli*.

GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA W/W TEMACIE

- Scharakteryzowanie dwóch systemów RM u *N. gonorrhoeae* FA1090. Zbadanie organizacji domen aminokwasowych w podjednostkach odpowiedzialnych za specyficzność systemu. Określenie ich specyficzności
- Wykazanie, że systemy RM NgoAV i NgoAX, kodowane przez *N. gonorrhoeae* FA1090 mogą ulegać zmienności fazowej
- Wykazanie, że zmienność fazowa badanych systemów RM powiązana jest z obecnością homo-nukleotydowych lub hetero-nukleotydowych powtórzeń, obecnych w genach kodujących podjednostki odpowiedzialne za rozpoznawanie specyficznej sekwencji w DNA
- Wykazanie, że w wyniku zmienności fazowej systemów RM, może dochodzić do wyłączenia systemu RM lub do zmiany jego specyficzności
- Zaproponowanie, że zjawisko zmienności fazowej genów kodujących metylotransferazy należące do systemów RM może podlegać presji endonukleazy restrykcyjnej w przypadku systemów Typu III

WPLYW EKSPRESJI SYSTEMÓW RESTRYKCJI-MODYFIKACJI NA FIZJOLOGIĘ I PATOGENNOŚĆ *NEISSERIA GONORRHOEAE*

PUBLIKACJE HABILITANTA W/W TEMACIE

Kwiatek A, Bacal P, Wasiluk A, Trybunko A, Adamczyk-Popławska M. 2014. The dam replacing gene product enhances *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 viability and biofilm formation. *Front Microbiol.* 5:712

Kwiatek A, Mrozek A, Bacal P, Piekarowicz A, Adamczyk-Popławska M. 2015. Type III Methyltransferase M.NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 Regulates Biofilm Formation and Interactions with Human Cells. *Front Microbiol.* 6:1426

Drugi etap mojej pracy dotyczył zbadania znaczenia biologicznego zmienności fazowej systemów RM w fizjologii komórki bakteryjnej. Aktualne badania sugerowały, że systemy RM, poza rolą w obronie przed infekcjami bakteriofagowymi, mogą także wpływać na wiele innych procesów (Vasu & Nagaraja, 2013). Przede wszystkim ukazały się doniesienia dotyczące udziału w epigenetyce i globalnej ekspresji genów nie tylko samotnych metylotransferaz, ale także metylotransferaz DNA, należących do systemów RM (Fox *et al.*,

2007; Srikhanta *et al.*, 2009; Srikhanta *et al.*, 2010; Srikhanta *et al.*, 2011). Kilku autorów opisało kontrolę ekspresji genów przez metylotransferazy Typu III u bakterii patogennych dla człowieka (Bayliss *et al.*, 2006; Srikhanta *et al.*, 2005; Srikhanta *et al.*, 2009; Srikhanta *et al.*, 2011). Postanowiłam więc sprawdzić, czy wykazana przeze mnie zmienność fazowa systemu NgoAX Typu III, ma znaczenie fizjologiczne i skutkuje zmianami w transkryptomie gonokoków.

Dokonałam porównania globalnego profilu transkrypcji genów w szczepie dzikim *N. gonorrhoeae* FA1090 oraz w stworzonym przez ze mnie wariacie ze zinaktywowanym genem NGO0545 kodującym podjednostkę Mod (zwanym tu mutantem delecyjnym). W tym celu, wykorzystałam metodę mikromacierzy ekspresyjnych. Dane literaturowe dotyczące zarówno izolacji RNA jak i mikromacierzy na modelu *Neisseria*, w momencie rozpoczęcia przeze mnie wspomnianych prac, były szczątkowe. Ponieważ uniwersalne protokoły izolacji RNA nie były wydajne w stosowanych warunkach eksperymentalnych, opracowałam metodę izolacji RNA z komórek *N. gonorrhoeae* hodowanych na podłożu stałym, uzupełnionym hemoglobina. Zaprojektowałam także macierz oligonukleotydów Agilent 034141, obejmującą wszystkie otwarte ramki odczytu (ang. ORF - *open reading frame*) zidentyfikowane w genomie *N. gonorrhoeae* FA1090 (AE004969). W doświadczeniu wykorzystałam metodę dwubarwnego znakowania cDNA. Do zbadania ekspresji w mutantcie delecyjnym w genie *mod* oraz w szczepie dzikim wykorzystałam cztery powtórzenia biologiczne. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu uzyskałam ogromną pulę danych, którą metodycznie przeanalizowałam dzięki specjalistycznemu oprogramowaniu GeneSpring pozwalającemu na statystyczne zbadanie i porównanie poziomu ekspresji genów.

Inaktywacja genu *mod* systemu RM NgoAX skutkuje zmianami w bakteryjnym transkryptomie. Z badań wynika, że poziom ekspresji 121 genów (co stanowi 5,6% genomu) jest, co najmniej dwukrotnie zmieniony w szczepie ze zinaktywowaną metylotransferazą NgoAX w porównaniu do szczepu dzikiego. 38 genów jest słabiej, a 83 silniej wyrażanych. Geny zostały podzielone na grupy homologiczne (ang. COG - *cluster of orthologous genes*) na podstawie motywów i domen, które można wyodrębnić w kodowanych przez te geny białkach. Wspólne domeny i motywy przypisane są do konkretnego procesu komórkowego. W badanym przypadku, u mutantu delecyjnego na wyższym poziomie, niż u kontrolnego szczepu dzikiego, wyrażane były geny kodujące białka biorące udział w replikacji i naprawie DNA lub też w formowaniu błony i otoczki. Natomiast poziom ekspresji genów, których produkty brały udział w wytworzeniu energii, był niższy. Wiele genów, których ekspresja ulega zmianie u mutantu delecyjnego, koduje produkty mogące brać udział w formowaniu biofilmu oraz w interakcjach międzykomórkowych: np. potencjalne adhezyny z rodziny Maf, białko OpaD lub inne białka biorące udział w formowaniu pili.

Wpływ ekspresji metylotransferazy NgoAX na fizjologię komórki *N. gonorrhoeae* zbadalam porównując zdolność szczepu dzikiego, mutantu delecyjnego oraz szczepu, w którym dochodziło do komplementacji aktywności metylotransferazy Mod, do formowania biofilmu oraz do oddziaływania z komórkami ludzkimi śródbłonna.

Dzięki obserwacjom, pod mikroskopem konfokalnym, 24 godzinnego biofilmu, formowanego przez badane szczepy *N. gonorrhoeae* na szkle, wykazałam, że biofilm, zbudowany z komórek z inaktywowanym genem kodującym NgoAX, posiada rozluźnioną strukturę, która zapada się podczas preparatyki próbki do obserwacji pod mikroskopem

elektronowym. Biofilm utworzony przez komórki, w których zainaktywowano gen NGO0545, jest gęsty i bierze w nim udział większa liczba komórek niż w biofilmie utworzonym przez komórki szczepu natywnego. Wydaje się jednak, że oddziaływania pomiędzy komórkami bakteryjnymi są zaburzone.

W celu zbadania oddziaływań pomiędzy *N. gonorrhoeae*, a komórkami gospodarza, zainicjowałam w Zakładzie Wirusologii hodowle tkankowe komórek nabłonka typu Hec1B. Są to komórki raka endometrium macicy, które stanowią model do infekcji gonokokami (Ilver *et al.*, 1998). Ekspresja genu kodującego podjednostkę Mod_{NgoAX} lub brak tej ekspresji wpływają na oddziaływanie bakterii z komórkami nabłonka na etapie adhezji do komórek eukariotycznych oraz na etapie penetracji tych komórek. Może to odzwierciedlać stan fizjologiczny: bakterie regulują swoje zdolności do adhezji i inwazji komórek ludzkich poprzez regulację ekspresji genów zależną od aktywności metylotransferazy należącej do systemu RM NgoAX. Podobna rola systemów RM Typu III w wirulencji i patogenności opisana została niedawno u *N. meningitidis* (Seib *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016).

Fakt, że samotne metylotransferazy np. Dam, odgrywają ogromną rolę w fizjologii komórek bakteryjnych jest od dawna znany. W komórkach *E. coli* metylotransferaza Dam bierze udział w replikacji DNA, segregacji chromosomów, naprawie postreplikacyjnej DNA (ang. *methyl-directed mismatch repair*), reguluje ekspresję genów oraz moduluje zmienność fazową (Casadesús & Low, 2006; Marinus & Casadesús, 2009). Wyniki analiz bioinformatycznych sugerują, że u *Neisseriaceae* w toku ewolucji doszło do wstawienia *locus*, zawierający gen *dam*, innego genu, nazwanego *drg* (ang. *dam replacing gene*) (Cantalupo *et al.*, 2001). Gen *drg* koduje białko wykazujące niewielkie podobieństwo do endonukleazy restrykcyjnej R.DpnI z *S. pneumoniae* (Siwek *et al.*, 2012). Wykazałam eksperymentalnie, że podobnie, jak R.DpnI, białko Drg jest endonukleazą restrykcyjną o specyficzności sekwencji G^{me}ATC (meA oznacza N6-metyloadeninę). Obecność aktywności endonukleolitycznej Drg wyklucza koegzystencję w tej samej komórce enzymu typu Dam, modyfikującego adeninę w sekwencjach GATC. Zdarzenie ewolucyjne, które doprowadziło do zmiany genotypu w *locus dam*, mające zapewne globalny wpływ na fizjologię *Neisseriaceae*, stało się inspiracją do kolejnego etapu moich badań. Ich celem było porównanie fizjologii natywnego szczepu *N. gonorrhoeae* FA1090 i dwóch mutantów, jednego z delecją *locus drg* oraz drugiego, w którym gen *drg* został zastąpiony genem *dam* z *N. meningitidis* FAM18.

Dzięki technice mikromacierzy ekspresyjnych, wykazałam, że poziom ekspresji 195 genów (8,94% wszystkich genów) jest zmieniony przynajmniej 1,5 razy w szczepie nie wyrażającym *drg*. Zaburzona jest głównie ekspresja genów, których produkty biorą udział w replikacji i naprawie DNA, translacji oraz formowaniu błony i ściany komórkowej (podwyższona ekspresja). Inny jest też profil transkrypcyjny szczepu wyrażającego metylotransferazę Dam, w którym dochodzi do zmian w ekspresji aż 240 genów (11% wszystkich genów). W tym przypadku, najliczniejszą grupę stanowią geny, których produkty biorą udział w wytwarzaniu energii oraz metabolizmie aminokwasów. W przypadku białek biorących udział w translacji większość kodujących je genów wykazuje niższy poziom ekspresji w komórkach ekspresyjnych gen *dam* niż w szczepie natywnym. Ogólnie, brak genu *drg* zmniejsza żywotność gonokoków powodując, że trudniej tworzą one biofilm, a także gorzej rosną w hodowli płynnej. Dzięki szczep *N. gonorrhoeae*, czyli wyrażający *drg*, wydajniej niż szczep nie wyrażający *drg* przyczepia się do komórek ludzkiego nabłonka

Hec1B. Być może nabycie genu *drg* przez gonokoki wiązało się z jednoczesnym zdobyciem zdolności do kolonizacji nowej niszy ekologicznej, komórek nabłonka macicy. Gen kodujący Drg, zawiera trakt homo-nukleotydowy trakt polyA (7 adenin) w części 5'. Tak więc, ekspresja Drg może ulegać zmienności fazowej (analogicznie do genu *hsdS1* kodującego system NgoAV), co przekładałoby się na zmianę ekspresji genów i zmiany w potencjale inwazyjności patogena. Opisane wyniki sugerują, że potencjalna regulacja ekspresji genu *drg*, kodującego endonukleazę restrykcyjną będzie wpływać na fizjologię *Neisseria*.

Reasumując, wykazałam, że gen *drg* z *N. gonorrhoeae* FA1090 koduje aktywną endonukleazę restrykcyjną. Ponadto z ewolucyjnego punktu widzenia, to obecność genu *drg* jest najbardziej „korzystna” dla *N. gonorrhoeae* podczas wzrostu bakterii, tworzeniu biofilmów lub podczas adhezji do komórek nabłonka. Dodatkowo, po raz pierwszy został wykazany wpływ regulacyjny białka o aktywności endonukleazy restrykcyjnej na ekspresję innych genów. Mechanizm działania Drg pozostaje jednakże nieznan.

Dane dotyczące mikromacierzy ekspresyjnych zdeponowałam w międzynarodowej bazie danych GEO (ang. *Gene Expression Omnibus*) na serwerze NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*).

GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA W/W TEMACIE

- Wykazanie, że metylotransferazy należące do systemów RM Typu III, mogą regulować ekspresję genów, podobnie jak samotne metylazy DNA
- Wykazanie, po raz pierwszy, że ekspresja endonukleazy restrykcyjnej należącej do systemów RM wpływa na ekspresję innych genów
- Wykazanie, że zmienność fazowa systemów RM powiązana jest ze zmiennością fazową innych genów: potwierdzono koncepcję tzw. „*phasevarion*” czyli grupy genów, rozsianych po genomie, które podlegają wspólnej kontroli ekspresji poprzez zmienność fazową systemów RM
- Wykazanie, że zmienność fazowa ekspresji genów kodujących systemy RM wpływa na konkretne właściwości komórek bakteryjnych np. na patogenność (tworzenie biofilmu, interakcje z ludzkimi komórkami nabłonka)

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszej rozprawie prace opisują systemy RM kodowane przez *N. gonorrhoeae* FA1090. Myślą przewodnią badań było wykazanie zmienności fazowej systemów RM, poznanie genetycznych podstaw ich zmienności, zbadanie wpływu zmienności tych systemów na ekspresję genów, a także wpływu zmienności ekspresji systemów RM na właściwości fizjologiczne gonokoków. Podczas badań, określiłam trzy nowe specyficzności oraz wykazałam aktywność gonokokowych systemów RM w układzie heterologicznym w *E. coli*. Wykazałam także, że geny kodujące systemy RM mogą ulegać zmienności fazowej, dzięki genetycznym elementom zawartym w ich sekwencji. Zmiana w ekspresji genów kodujących systemy RM prowadzi do globalnej modulacji transkryptomu, co przekłada się na zmiany w zdolności gonokoków do tworzenia biofilmu, wzajemne interakcje pomiędzy komórkami bakteryjnymi, a także w oddziaływaniu patogenów

z komórkami gospodarza. Ciekawym wynikiem jest wykazanie zmian w ekspresji wielu genów poprzez endonukleazę restrykcyjną Drg. Jest to pierwsze doniesienie o możliwości regulacji ekspresji genów przez białko o aktywności endonukleolitycznej. Przeprowadzone badania mają wymiar intradyscyplinarny dzięki zastosowaniu w nich metod biologii molekularnej, biochemii, mikrobiologii, hodowli tkankowej, obrazowania i transkryptomiki. Uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny: ewentualna blokada systemów RM, np. poprzez zaburzenie metylacji adeniny w przypadku systemów Typu III, może prowadzić do zahamowania zmienności bakterii, a zmienność odgrywa ważną rolę w patogenności i zjadliwości. Zaprojektowanie leków tego typu stanowiłoby nową formę strategii walki z infekcjami gonokokowymi.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- Badanie regulacji transkryptomu *Neisseria* poprzez system RM NgoAV (ON, OFF oraz ze zmienioną specyficznością): dane dotyczące regulacji ekspresji genów przez Typ I RM są nieliczne
- Badanie aktywności oraz roli systemów RM w różnych warunkach fizjologicznych/środowiskowych: poziom ekspresji różnych systemów RM w komórkach rosnących w różnych niszach ekologicznych. Rozszerzenie typu hodowli tkankowych
- Scharakteryzowanie innych systemów RM z *N. gonorrhoeae* oraz *N. meningitidis*.
- Badanie innych determinantów patogenności: np. przeżywalności *N. gonorrhoeae* w komórkach endometrium, transcytozy przez komórki endometrium, aktywacji układu odpornościowego oraz wpływu metylaz należących do systemów RM na te procesy
- Wpływ przewlekłej infekcji *N. gonorrhoeae* na nowotworzenie w komórkach nabłonka endometrium i cewki moczowej

LITERATURA

Abadjieva, A., Patel, J., Webb, M., Zinkevich, V. & Firman, K. (1993). A deletion mutant of the type IC restriction endonuclease EcoR1241 expressing a novel DNA specificity. *Nucleic Acids Res* 21, 4435-4443.

Bayliss, C. D., Callaghan, M. J. & Moxon, E. R. (2006). High allelic diversity in the methyltransferase gene of a phase variable type III restriction-modification system has implications for the fitness of *Haemophilus influenzae*. *Nucleic Acids Res* 34, 4046-4059.

Bertani, G. & Weigle, J. J. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* 65, 113-121.

Bickle, T. A. (2004). Restricting restriction. *Mol Microbiol* 51, 3-5.

- Cantalupo, G., Bucci, C., Salvatore, P., Pagliarulo, C., Roberti, V., Lavitola, A., Bruni, C. B. & Alifano, P. (2001). Evolution and function of the neisserial dam-replacing gene. *FEBS Lett* 495, 178-183.
- Casadesús, J. & Low, D. (2006). Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 830-856.
- Cohen, M. S. & Sparling, P. F. (1992). Mucosal infection with *Neisseria gonorrhoeae*. Bacterial adaptation and mucosal defenses. *J Clin Invest* 89, 1699-1705.
- De Bolle, X., Bayliss, C. D., Field, D., van de Ven, T., Saunders, N. J., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (2000). The length of a tetranucleotide repeat tract in *Haemophilus influenzae* determines the phase variation rate of a gene with homology to type III DNA methyltransferases. *Mol Microbiol* 35, 211-222.
- Dybvig, K., Cao, Z., French, C. T. & Yu, H. (2007). Evidence for type III restriction and modification systems in *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol* 189, 2197-2202.
- Foley, J. (2015). Mini-review: Strategies for Variation and Evolution of Bacterial Antigens. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 407-416.
- Fox, K. L., Dowideit, S. J., Erwin, A. L., Srihanta, Y. N., Smith, A. L. & Jennings, M. P. (2007). *Haemophilus influenzae* phasevariations have evolved from type III DNA restriction systems into epigenetic regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* 35, 5242-5252.
- Girardot, M., Feil, R. & Llères, D. (2013). Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics* 5, 715-728.
- Gray-Owen, S. D., Lorenzen, D. R., Haude, A., Meyer, T. F. & Dehio, C. (1997). Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 26, 971-980.
- Gubler, M., Braguglia, D., Meyer, J., Piekarowicz, A. & Bickle, T. A. (1992). Recombination of constant and variable modules alters DNA sequence recognition by type IC restriction-modification enzymes. *EMBO J* 11, 233-240.
- Holmes, K. K. (1999). Sexually Transmitted Diseases: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Ilver, D., Källström, H., Normark, S. & Jonsson, A. B. (1998). Transcellular passage of *Neisseria gonorrhoeae* involves pilus phase variation. *Infect Immun* 66, 469-473.
- Jarvis, G. A. & Chang, T. L. (2012). Modulation of HIV transmission by *Neisseria gonorrhoeae*: molecular and immunological aspects. *Curr HIV Res* 10, 211-217.
- Jordan, P. W., Snyder, L. A. & Saunders, N. J. (2005). Strain-specific differences in *Neisseria gonorrhoeae* associated with the phase variable gene repertoire. *BMC Microbiol* 5, 21.
- Kneale, G. G. (1994). A symmetrical model for the domain structure of type I DNA methyltransferases. *J Mol Biol* 243, 1-5.
- Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* 29, 3742-3756.

- Low, D. A., Weyand, N. J. & Mahan, M. J. (2001). Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* 69, 7197-7204.
- Luria, S. E. & Human, M. L. (1952). A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* 64, 557-569.
- Marinus, M. G. & Casadesus, J. (2009). Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol Rev* 33, 488-503.
- Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 412-434.
- 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, 1199-1210.
- Rao, D. N., Dryden, D. T. & Bheemanaik, S. (2014). Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective. *Nucleic Acids Res* 42, 45-55.
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T. & other authors (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 31, 1805-1812.
- Salaün, L., Snyder, L. A. & Saunders, N. J. (2003). Adaptation by phase variation in pathogenic bacteria. *Adv Appl Microbiol* 52, 263-301.
- Seib, K. L., Jen, F. E., Tan, A. & other authors (2015). Specificity of the ModA11, ModA12 and ModD1 epigenetic regulator N(6)-adenine DNA methyltransferases of *Neisseria meningitidis*. *Nucleic Acids Res* 43, 4150-4162.
- Siwek, W., Czapinska, H., Bochtler, M., Bujnicki, J. M. & Skowronek, K. (2012). Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R.DpnI. *Nucleic Acids Res* 40, 7563-7572.
- Snyder, L. A., Butcher, S. A. & Saunders, N. J. (2001). Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp. *Microbiology* 147, 2321-2332.
- Srikhanta, Y. N., Maguire, T. L., Stacey, K. J., Grimmond, S. M. & Jennings, M. P. (2005). The phasevarion: a genetic system controlling coordinated, random switching of expression of multiple genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5547-5551.
- Srikhanta, Y. N., Dowideit, S. J., Edwards, J. L. & other authors (2009). Phasevarions mediate random switching of gene expression in pathogenic *Neisseria*. *PLoS Pathog* 5, e1000400.
- Srikhanta, Y. N., Fox, K. L. & Jennings, M. P. (2010). The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* 8, 196-206.
- Srikhanta, Y. N., Gorrell, R. J., Steen, J. A., Gawthorne, J. A., Kwok, T., Grimmond, S. M., Robins-Browne, R. M. & Jennings, M. P. (2011). Phasevarion mediated epigenetic gene regulation in *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 6, e27569.

- Stein, D. C., Gunn, J. S., Radlinska, M. & Piekarowicz, A. (1995). Restriction and modification systems of *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* 157, 19-22.
- Tan, A., Hill, D. M., Harrison, O. B., Srihanta, Y. N., Jennings, M. P., Maiden, M. C. & Seib, K. L. (2016). Distribution of the type III DNA methyltransferases modA, modB and modD among *Neisseria meningitidis* genotypes: implications for gene regulation and virulence. *Sci Rep* 6, 21015.
- van der Woude, M. W. & Bäumler, A. J. (2004). Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17, 581-611, table of contents.
- van der Woude, M. W. (2006). Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* 254, 190-197.
- Vasu, K. & Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 53-72.
- Williams, R. J. (2003). Restriction endonucleases: classification, properties, and applications. *Mol Biotechnol* 23, 225-243.
- Xia, Y., Burbank, D. E. & Van Etten, J. L. (1986a). Restriction endonuclease activity induced by NC-1A virus infection of a *Chlorella*-like green alga. *Nucleic Acids Res* 14, 6017-6030.
- Xia, Y. N., Burbank, D. E., Uher, L., Rabussay, D. & Van Etten, J. L. (1986b). Restriction endonuclease activity induced by PBCV-1 virus infection of a *Chlorella*-like green alga. *Mol Cell Biol* 6, 1430-1439.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIAGNIĘCIA NAUKOWO BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA
(nazwisko panięskie - Adamczyk)

DZIAŁANIE OKSYSTEROLI NA PATOGENNE KOMÓRKI GLEJOWE SZCZURA WISTAR

- Bochelen D, Langley K, **Adamczyk M**, Kupferberg A, Hor F, Vincendon G, Mersel M. 2000. 7beta-hydroxysterol is cytotoxic to neonatal rat astrocytes in primary culture when cAMP levels are increased. *J Neurosci Res.* 62(1):99-111
- Adamczyk M**, Scherrer E, Kupferberg A, Malviya AN, Mersel M. 1998. Inhibition of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by oxysterols in rat astrocyte primary cultures and C6 glioma cell lines. *J Neurosci Res.* 53(1):38-50
- Werthle M, Bochelen D, **Adamczyk M**, Kupferberg A, Poulet P, Chambron J, Lutz P, Privat A, Mersel M. 1994. Local administration of 7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate inhibits growth of experimental rat C6 glioblastoma. *Cancer Res.* 54(4):998-1003

Badania dotyczyły potencjału terapeutycznego oksydowanych steroli, a szczególnie 7 β -hydroksycholesterolu oraz jego pochodnej, 7 β -hydroksycholesteryl-3-oleatu, względem tzw. gliozy, czyli zmian patologicznych w komórkach glejowych mózgu wywołanych urazem fizycznym (występuje wtedy patologiczna reakcja komórek astrocytarnych, które niekontrolowanie proliferują), lub glejaka wielopostaciowego, czyli zmian nowotworowych pochodzenia astrocytarnego (jest to także forma niekontrolowanej proliferacji). Badania były prowadzone na modelu hodowli tkankowej szczurzych komórek C6 *in vitro* oraz na modelu zwierzęcym z wszczepionymi w mózg sześciodniowego szczura Wistar komórkami nowotworowymi typu C6. W badaniach wykazano, że podany *in vivo* lub *in vitro* 7 β -hydroksycholesterol nie jest toksyczny względem komórek normalnych (hodowli astrocytów lub komórek nerwowych). Efekt cytopatyczny ma miejsce wyłącznie względem komórek z podwyższonym poziomem cAMP- czyli komórek biorących udział w gliozie (tzw. komórki reaktywne) lub też względem komórek nowotworowych typu C6. W modelu *in vivo* wykazano, że wśród badanych pochodnych 7 β -hydroksycholesterolu, tylko 7 β -hydroksycholesteryl-3-oleat posiada duży potencjał terapeutyczny i blokuje rozwój glejaka wielopostaciowego. Jednoczesna iniekcja komórek nowotworowych C6 oraz oksysterolu zapobiegała rozwojowi glejaka u 80% badanych zwierząt. Iniekcja leku 3 dni po wszczepieniu komórek nowotworowych hamowała rozwój nowotworu o ponad 80% jeżeli chodzi o wielkość guza leczonego w porównaniu do guza nieleczonego.

In vitro, badania nad mechanizmem działania oksysteroli wykazały, że te utlenione formy cholesterolu obniżają w komórkach reaktywnych i nowotworowych poziom aktywności kinaz z grupy MAPK (ang. *mitogen activated protein kinases*). Jednakże samo zahamowanie szlaku sygnałowego z udziałem MAPK nie jest wystarczające do uzyskania efektu cytopatycznego. Dalsze badania *in vitro* w modelu komórek reaktywnych wykazały, że 7 β -hydroksycholesterol blokuje działanie kinazy PKA zależnej od poziomu c-AMP. Wiadomo, że PKA aktywuje szlak MAPK, tak więc mechanizm działania oksysteroli w komórkach biorących udział w gliozie oraz w komórkach nowotworowych może być podobny i związany z blokowaniem niekontrolowanej proliferacji komórkowej.

OSIAGNIĘCIA NAUKOWO BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

PROTEOMIKA W OPRACOWANIU SZCZEPIONEK

Adamczyk-Poplawska M, Markowicz S, Jagusztyn-Krynicka EK. 2011. Proteomics for development of vaccine. *J Proteomics*. 74(12):2596-2616

Jest to praca przeglądowa dotycząca zastosowania nowoczesnych metod badawczych, takich jak proteomika, w opracowywaniu nowych szczepionek skierowanych przeciwko patogennym bakteriom, wirusom oraz nowotworom. Praca przedstawia ogólne dane dotyczące szczepionek ze szczególnym uwzględnieniem raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Opisane zostały najnowsze doniesienia, w których zastosowanie metod należących do szeroko rozumianej proteomiki pod różnymi aspektami pozwoliło np. na

identyfikację i charakteryzację nowych antygenów do potencjalnego wykorzystania w opracowywanych szczepionkach.

SEKWENCJE PROFAGOWE W CHROMOSOMIE *NEISSERIA GONNORHOEAE* FA1090

Piekarowicz A, Klyz A, Majchrzak M, **Adamczyk-Popławska M**, Mangel TK, Stein DC. 2007. Characterization of the dsDNA prophage sequences in the genome of *Neisseria gonorrhoeae* and visualization of productive bacteriophage. *BMC Microbiol.* 7:66

Piekarowicz A, Majchrzak M, Klyz A, **Adamczyk-Popławska M**. 2006. Analysis of the filamentous bacteriophage genomes integrated into *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 chromosome. *Pol J Microbiol.* 55(4):251-260

Postępy w sekwencjonowaniu dużych genomów przyczyniły się do odkrycia licznych sekwencji bakteriofagowych obecnych w genomach wielu bakterii. W/w prace opisują między innymi bioinformatyczne analizy i porównywania sekwencji gonokokowych profagów do znanych bakteriofagów. W genomie *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 odkryto obecność 5 fagów tzw. dsDNA (o genomie w formie dwuniciowego DNA) oraz 4 fagów filamentowych należących do grupy ssDNA (o genomie w formie jednoniciowego DNA). Filamentowy bakteriofag Ngo ϕ 6 został opisany jako prototyp bakteriofagów filamentowych dla bakterii z gatunku *Neisseria*. Obecność tzw. wysp fagowych w genomach bakterii może skutkować ekspresją genów fagowych, i wyrażeniem fagowych białek na powierzchni komórek bakteryjnych. Białka pochodzenia wirusowego mogą stanowić nowe cele dla szczepionek terapeutycznych. Niektóre białka fagów dwuniciowych Ngo ϕ 1 i Ngo ϕ 2 zostały sklonowane i ekspymowane w systemie heterologicznym w *E. coli*. Obrazowanie mikroskopią elektronową supernatanów z hodowli komórkowych *N. gonorrhoeae* wykazało obecność wielu form bakteriofagowych. Jest to pierwsze, i do tej pory jedyne, doniesienie opisujące powstawanie cząstek fagowych w rodzaju *Neisseria*.

ROLA GLIKOFORYNY W DESETYTROPOETYCZNEJ NIEDOKRWISTOŚCI WRODZONEJ

Zdebska E, **Adamczyk-Popławska M**, Kościelak J. 2000. Glycophorin A in two patients with congenital dyserythropoietic anemia type I and type II is partly unglycosylated. *Acta Biochim Pol.* 47(3):773-779

Praca dotyczyła badania glikoforyny, transbłonowej sialoglikoproteiny, wyizolowanej z błon erytrocytów pacjentów z wrodzoną niedokrwistością dyserytropoetyczną (CDA) typu I lub typu II. CDA są zaliczane do rzadkich, wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych, często dziedzicznych. Charakteryzują się wzmożoną, nieefektywną erytropoezą oraz obecnością nieprawidłowych wielojądrzastych erytroblastów w szpiku. Dzięki nowo opracowanej technice, po rozdziale elektroforetycznym białek wyizolowanych z erytrocytów i ich transferowi na membrany PVDF, analizowano skład węglowodanów w badanej glikoproteinie poprzez chromatografię jonowymienną. Wyniki badań wykazały spadek reszt cukrowych N-acetylogalaktozaminy, galaktozy i kwasu sialowego w glikoforynie A

u pacjentów z CDA typu I (spadek około 45%) i w przypadku CDA typu II (55%). Wyniki sugerują że glikoforyna A u tych pacjentów jest częściowo nieglikozylowana w stosunku do O-glikanów. Ponadto, glikoforyna A wyizolowana z krwinek pacjentów z CDA typu II, wykazywała znaczny deficyt w mannozę i N-acetyloglukozaminę, co sugeruje, że N-glikozylacja również jest zaburzona w tym typie niedokrwistości. Niniejsze badania po raz pierwszy wykazały zaburzenia w glikozylacji glikoforyny u pacjentów z CDA, co ogólnie ukierunkowuje badania na rolę glikozylacji białek w prawidłowej budowie komórek erytrocytarnych.

POCHODNE 7 β -HYDROXYCHOLESTEROLU W LECZENIU GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO

Rakotoarivelo C, Adamczyk M, Desgeorges M, Langley K, Lorentz JG, Mann A, Ricard D, Scherrer E, Privat A, Mersel M. 2006. 7beta-hydroxycholesterol blocked at C-3-OH inhibits growth of rat glioblastoma in vivo: comparison between 7beta-hydroxycholesteryl-3beta (ester)-oleate and 7beta-hydroxycholesteryl-3-beta-O(ether)-oleyl. *Anticancer Res.* 26(3A):2053-2062

Jest to kontynuacja prac dotyczących utlenionych steroli, oraz ich potencjalnego hamowania rozwoju glejaka wielopostaciowego. W tej pracy podjęto próbę udoskonalenia 7 β -hydroksycholesteryl-3-oleatu tzn. zablokowania hydrolizy wiązania estrowego tego związku do nieaktywnego *in vivo* 7 β -hydroksycholesterolu. Hydroliza formy estrowej ma miejsce w mózgu dzięki tzw. „esterazom” komórkowym. Hydrolizowane jest aż 99% formy estrowej w 48 godzin od podania leku *in situ* do tkanki nowotworowej w mózgu. Poprzez syntezę chemiczną uzyskano formę eterową: 7 β -hydroksycholesteryl-3- β -O(eter)-oleylu, która nie ulega hydrolizie ponieważ nie wykazano istnienia tzw. „eteraz”. Badania wykazały, że stosowanie formy eterowej jest jeszcze skuteczniejsze niż aplikacja formy estrowej względem glejaka wywołanego poprzez wszczepienie komórek nowotworowych typu C6 w korę mózgową 6 dniowego szczura Wistar. Pochodne 7 β -hydroksycholesterolu są obiecującymi substancjami w chemioterapii glejaków.

6. Dane bibliometryczne.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z 2015 wykorzystano ostatnio dostępną wartość IF₂₀₁₄) - **41,585**
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wszystkie publikacje habilitanta - **355**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji do dnia złożenia wniosku (wg bazy WoS) - **91**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji do dnia złożenia wniosku (wg bazy WoS), bez autocytowań - **81**
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy WoS) - **6**

Adamczyk-Popławska

