

AUTOREFERAT**1. Imię i Nazwisko.**

Katarzyna Potrykus

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

Tytuł magistra biotechnologii – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański- Akademia Medyczna w Gdańsku, czerwiec 1999 r.

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, listopad 2003 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Regulacja transkrypcji i replikacji bakteriofaga λ – rola czterofosforanu guanozyny (ppGpp) w kontroli aktywności promotorów.”

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

2003- chwila obecna adiunkt, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Biologii Molekularnej

(Maj 2004-Maj 2012 staż naukowy w National Institutes of Health, Bethesda, USA)

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**

Wpływ (p)ppGpp i czynników transkrypcyjnych GreA, GreB oraz DksA, na polimerazę RNA i globalną regulację komórkową u *Escherichia coli*.

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

[1] **Potrykus K**, Vinella D, Murphy H, Szalewska-Palasz A, D'Ari R, Cashel M. (2006) Antagonistic regulation of *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB P1* promoter activity by GreA and DksA. *J Biol Chem.* 281(22):15238-48. (IF 2006 = 5.808)

[2] **Potrykus K**, Cashel M. (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol.* 62:35-51. (IF 2008 = 10.902)

[3] **Potrykus K**, Murphy H, Chen X, Epstein JA, Cashel M. (2010) Imprecise transcription termination within *Escherichia coli greA* leader gives rise to an array of short transcripts, GraL. *Nucleic Acids Res.* 38(5):1636-51. (IF 2010 = 7.836)

[4] Potrykus K, Murphy H, Philippe N, Cashel M. (2011) ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ Microbiol.* 13(3):563-75. (IF 2010 = 5.537)

[5] Vinella D, Potrykus K, Murphy H, Cashel M. (2012) Effects on growth by changes of the balance between GreA, GreB, and DksA suggest mutual competition and functional redundancy in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 194(2):261-73. (IF 2010 = 3.726)

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

Celem naukowym wyżej wymienionych prac było poszerzenie wiedzy na temat wpływu bakteryjnych czynników transkrypcyjnych na polimerazę RNA pod kątem odpowiedzi ściślej i rozluźnionej zachodzącej w komórkach *Escherichia coli*. Odpowiedź ścisła jest to zjawisko zachodzące w komórkach pod wpływem różnego rodzaju stresu lub głodu (np. głód aminokwasowy, węglowy, azotowy, żelazowy, fosforanowy, lipidowy, a także stres oksydacyjny i temperaturowy). W takich warunkach dochodzi do powstawania specyficznych nukleotydów, czterofosforanu guanozyny (5'-difosforan 3'-difosforan guanozyny, inaczej ppGpp) i pięciofosforanu guanozyny (5'-trifosforan, 3'-difosforan guanozyny, inaczej pppGpp). W skrócie można je oznaczać jako (p)ppGpp. Obydwa nukleotydy mogą być syntetyzowane przez białka RelA i SpoT, a powstają z GDP (w przypadku ppGpp) lub GTP (w przypadku pppGpp) oraz ATP. Jak dotąd, w miarę dokładnie poznany jest tylko mechanizm stymulacji syntezy (p)ppGpp w przypadku białka RelA, które ulega aktywacji jedynie podczas głodu aminokwasowego. RelA wiąże się do rybosomu i gdy następuje zahamowanie translacji na skutek braku tRNA naładowanego odpowiednim aminokwasem, dochodzi do syntezy (p)ppGpp. Z kolei SpoT jest odpowiedzialne za syntezę (p)ppGpp na skutek głodu i stresu innego niż głód aminokwasowy. Dotychczas udało się wykazać aktywację SpoT tylko na skutek głodu lipidowego, a sygnały aktywujące to białko podczas innych stresów nie są do tej pory poznane. SpoT ma również dodatkową funkcję, a mianowicie usuwa nadmiar (p)ppGpp z komórki poprzez jego hydrolizę, co ma duże znaczenie gdy warunki środowiskowe ulegną polepszeniu. Pozwala to bakteriom szybko przestawić swój metabolizm aby jak najbardziej efektywnie wykorzystać nowe zasoby.

Nukleotyd (p)ppGpp jest w miarę dobrze poznany czynnikiem transkrypcyjnym, który bezpośrednio oddziałuje na polimerazę RNA poprzez wiązanie się do tego enzymu. Miejsce wiązania nie jest do końca poznane (istnieją sprzeczne doniesienia na ten temat), aczkolwiek znajduje się ono prawdopodobnie w sąsiedztwie centrum katalitycznego. Istnieje natomiast zgodność, iż (p)ppGpp odgrywa największą rolę przede wszystkim na etapie inicjacji transkrypcji, a więc etapu, który można określić jako ten gdy polimeraza RNA wiąże się do rejonu promotora na DNA, tworzy kompleks zamknięty, następnie kompleks otwarty (gdy dochodzi do rozerwania dwuniciowej struktury DNA i powstania tzw. bąbla transkrypcyjnego), a następnie syntezy pierwszych wiązań fosforanowych w nowopowstającym RNA. W momencie gdy polimeraza RNA opuszcza rejon promotora, mamy już do czynienia z elongacją transkrypcji, a następnie z terminacją gdy dochodzi do zakończenia transkrypcji.

Interesujące jest to, że (p)ppGpp wywiera różny wpływ na transkrypcję zachodzącą z danego promotora w zależności od struktury tegoż promotora. Dla przykładu (p)ppGpp może mieć wpływ hamujący albo aktywujący, ewentualnie nie mieć istotnego wpływu na inicjację

transkrypcji z danego promotora. Wpływ hamujący jest przede wszystkim obserwowany w przypadku promotorów rybosomalnych (takich, które promują syntezę rRNA) i promotorów tRNA. Ponieważ rRNA i tRNA stanowią zwykle ok. 80% całkowitego RNA w komórkach, można było łatwo zauważyć zahamowanie ich syntezy w początkowych pracach nad głodem komórkowym. Zauważono ścisłą korelację pomiędzy głodzeniem aminokwasowym, a spadkiem poziomu RNA w komórce i dlatego też odpowiedź tę nazwano odpowiedzią ścisłą. Natomiast w komórkach pozbawionych genów *relA* i *spoT* odpowiedzi takiej nie zanotowano, więc w komórkach ppGpp⁰ (całkowicie pozbawionych (p)ppGpp) procesy zachodzące pod wpływem różnych głodów/stresów nazwano odpowiedzią rozluźnioną.

Wracając do odpowiedzi ścisłej, zaobserwowano pewną prawidłowość- otóż zahamowaniu ulega transkrypcja tych genów, których produkty biorą udział w procesach bardzo kosztownych pod względem energetycznym, a których synteza wydaje się zbędna w warunkach głodu lub stresu (np. wspomniana synteza rybosomów). Z kolei aktywacji ulegają geny, których produkty mogą być przydatne do przetrwania, jak np. geny szlaków biosyntezy aminokwasów. Komórki ppGpp⁰ nie są w stanie rosnąć na pożywkach minimalnych właśnie z powodu braku aktywacji genów syntezy aminokwasów.

Przez wiele lat hamujący wpływ (p)ppGpp na polimerazę RNA obserwowano w warunkach *in vivo* oraz w czystych układach *in vitro*. Natomiast aktywację transkrypcji obserwowano tylko w warunkach *in vivo*; w warunkach *in vitro* aktywacja transkrypcyjna przez (p)ppGpp obserwowana była tylko przy użyciu ekstraktów komórkowych (z jednym wyjątkiem, gdzie zademonstrowaliśmy aktywację promotora paQ w czystym układzie *in vitro*). Sytuacja dramatycznie zmieniła się w 2004 roku, gdy odkryto, iż białko DksA jest niezbędnym kofaktorem potrzebnym do aktywacji transkrypcji przez (p)ppGpp w przypadku promotorów genów biosyntezy aminokwasów. Doprowadziło to do eksplozji nowych prac i wyzwań w dziedzinie związanej z (p)ppGpp i odpowiedzią ścisłą.

Stało się to również punktem wyjścia cyklu prac, które są tutaj prezentowane jako „osiągnięcie naukowe”. Wkrótce zaistniało też duże zapotrzebowanie na pracę przeglądową, którą napisałam wraz z Dr M. Cashel'em [praca 2], co odzwierciedla stosunkowo duża liczba jej cytowań (168 według bazy Web of Science).

Pod względem struktury, DksA bardzo przypomina inne, lepiej poznane, czynniki transkrypcyjne, takie jak GreA, GreB (obecne u bakterii) oraz TFIIS (u eukaryota). Białka te charakteryzują się posiadaniem domeny w kształcie palca (ang. tzw. „finger domain”), utworzonej ze skręconych helis białkowych (ang. tzw. struktura „coiled coil”), oraz domeny globularnej. Uważa się, że białka te wiążą się do polimerazy RNA za pomocą domeny globularnej, natomiast domena palcowa jest wprowadzana do drugorzędowego kanału polimerazy RNA (ang. tzw. „secondary channel”). Na końcu domeny palcowej znajdują się dwie reszty kwaśnych aminokwasów, które po związaniu białka do polimerazy RNA, znajdują się blisko centrum katalicznego enzymu; uważa się, że odgrywają one ważną rolę w funkcjonowaniu białek GreA/GreB. Wykazano, iż zarówno GreA jak i GreB oddziałują na polimerazę RNA wyłącznie na etapie elongacji transkrypcji. Ich funkcja polega na przywróceniu aktywności polimerazie w przypadku zahamowania transkrypcji na skutek cofnięcia się polimerazy i wyskoczenia wolnego końca 3' nowosyntetyzowanego RNA z odpowiedniego miejsca w centrum katalicznym (zjawisko to w języku ang. nazywane jest „backtracking”). Aby doszło do wznowienia transkrypcji, musi zajść wycięcie fragmentu RNA wystającego poza

miejsce +1 w centrum katalitycznym, tak by mógł być dodany kolejny nukleotyd. Pokazano natomiast, iż DksA nie posiada takich właściwości.

Z dużym zaciekawieniem postanowiłam zatem zbadać, czy z kolei GreA i GreB dzielą funkcję DksA, tzn. czy białka te odgrywają rolę w odpowiedzi ściślejszej oraz czy współdziałają z (p)ppGpp. Moje pierwsze badania były oparte na modelu rybosomalnego promotora *rrnB P1* i były prowadzone zarówno w systemach *in vivo* oraz *in vitro* [praca 1]. Okazało się, iż GreA nie tylko zachowuje się w sposób antagonistyczny do DksA (w przeciwieństwie do DksA, GreA aktywuje transkrypcję zachodzącą z tego promotora) ale udokumentowałam także, iż białko to działa również na etapie inicjacji transkrypcji, a nie tylko elongacji. Wpływ GreA okazał się być niezależny od obecności (p)ppGpp.

Nie zaobserwowałam aby GreB miało duży wpływ na transkrypcję zachodzącą z promotora *rrnB P1*, jednak nie wyklucza to ewentualnego wpływu tego białka na inne promotory.

Zrodził się wtedy również pomysł, iż GreA, GreB i DksA mogą konkurować ze sobą o wiązanie do polimerazy RNA, co wstępnie potwierdziły wyniki moich badań *in vitro*. Znaczyłyby to, że istnieje dodatkowy etap regulacji transkrypcji, ściśle powiązany z regulacją wywieraną przez (p)ppGpp. Wyniki tych badań, przeprowadzonych głównie w warunkach *in vivo*, są przedstawione w opublikowanej pracy [praca 5].

Okazało się, że aby doszło do aktywacji genów biosyntezy aminokwasów, nie jest wymagana obecność (p)ppGpp (z wcześniejszych obserwacji wynikało, że szczepy ppGpp⁺ rosną na pożywkach minimalnych, lecz szczepy ppGpp⁰ nie rosną); wystarczającym warunkiem jest nadprodukcja DksA lub GreA, ale tylko wtedy gdy brak jest drugiego białka. Dokładniej, nadprodukcja DksA powoduje wzrost komórek ppGpp⁰ na podłożu minimalnym tylko w szczepach dodatkowo pozbawionych genu *greA*; podobnie, nadprodukcja GreA powoduje wzrost na podłożu minimalnym tylko szczepów ppGpp⁰ *dksA*⁻.

Ponadto, brak wzrostu szczepów ppGpp⁺ *dksA*⁻ na podłożach minimalnych może być odwrócony przez nadprodukcję GreA. Oznacza to, że GreA i DksA w niektórych warunkach mogą działać wymiennie, lecz w innych działają antagonistycznie do siebie. Potwierdziły to również moje doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem mikromacierzy transkrypcyjnych. Właśnie te dane pozwoliły również na pokazanie, że GreB odgrywa rolę w sieci wzajemnych oddziaływań między białkami wiążącymi się do drugorzędowego kanału polimerazy RNA. Mimo, że nadprodukcja białka GreB nie jest w stanie zezwolić na wzrost szczepu ppGpp⁰ na podłożu minimalnym, to jednak istnieje pewna grupa genów, która jest regulowana przez to białko gdy dodatkowo komórki pozbawione są genu *dksA*. Pozwoliło to na ustalenie pewnej hierarchii pomiędzy białkami. Mianowicie, DksA i GreA zdają się wywoływać największy efekt i najbardziej konkurować o wiązanie do polimerazy RNA; GreB zdaje się być mniej wydajne pod tym względem. Można było także ustalić wzajemną regulację pomiędzy GreA, GreB i DksA, która zachodzi prawdopodobnie na etapie transkrypcji.

Dodatkowo, w powyższej regulacji nie mają znaczenia reszty kwasowych aminokwasów domeny palcowej, które wcześniej były uważane za konieczne do pełnienia funkcji przez GreA i GreB na etapie elongacji transkrypcji. Wydaje się więc prawdopodobne, iż białka te powodują aktywację transkrypcji zachodzącą z promotorów biosyntezy aminokwasów poprzez inny mechanizm niż do tej pory opisany.

W mojej pracy nad czynnikami GreA, GreB i DksA skupiłam się również nad regulacją genów kodujących te białka. Do tej pory nie było żadnych doniesień na ten temat. Owocem tych

badan jest publikacja [praca 3], w której pokazałam, iż GreA ulega autoregulacji. Delecja genu *greA* powoduje wzrost aktywności transkrypcji zachodzącej z rejonu promotorowego *greA*, natomiast nadprodukcja GreA powoduje zahamowanie transkrypcji. Po dokładnym zmapowaniu rejonu promotorowego okazało się, że istnieją dwa bardzo silne promotory (P1, zależny od σ^{70} , oraz P2, zależny od σ^E), które zachodzą na siebie. Co ciekawe, autoinhibicja przez GreA, obserwowana *in vivo*, nie zachodzi *in vitro*, co świadczy, iż obserwowany efekt jest albo pośredni, albo wymagany jest dodatkowy czynnik, którego brakuje w systemie *in vitro*.

Niemniej jednak, doświadczenia te doprowadziły do bardzo ciekawej obserwacji- odkryłam mianowicie obecność niespotykanego terminatora w rejonie promotorowym *greA*. Nie dość, że terminator ten powoduje zakończenie transkrypcji prawie 2/3 wszystkich transkryptów inicjowanych z P1 i P2 (tylko 1/3 transkryptów prowadzi więc do powstania mRNA *greA*) to na dodatek terminacja ta jest wielce nieprecyzyjna: z każdego promotora powstaje ok. 10 różnych przedwcześnie zakończonych RNA, różniących się od siebie o 1-10 nukleotydów w długości. Co więcej, sama struktura terminatora jest niezwykle: strukturę szpilki do włosów tworzy aż 11 par zasad, podczas gdy najbardziej rozpowszechnione są terminatory posiadające tylko 6-7 par zasad w takiej strukturze.

Skloniło to mnie do dokładniejszego przyjrzenia się powstającym transkryptom. Po potwierdzeniu, że transkrypty te są uwalniane z kompleksów transkrypcyjnych (a więc nie dochodzi do utknięcia polimerazy RNA na DNA), postanowiłam zbadać czy te krótkie fragmenty RNA pełnią jakąś funkcję fizjologiczną. Przeprowadzone doświadczenia jednoznacznie wskazały, że powstające sRNA (z ang. „short RNA” – krótkie RNA) w istocie wpływają na ekspresję ok. 100 różnych genów. Zwieńczeniem tej publikacji było więc wykrycie nieznanego wcześniej sRNA, które nazwałam GraL (od „*greA* leader”).

W swoich badaniach postanowiłam również ustosunkować się do pytania czy (p)ppGpp odpowiada za regulację tempa przyrostu masy komórkowej (ang. tzw. „growth rate control”). Jest to pytanie niebagatelne, gdyż od ponad 20 lat istniały sprzeczne doniesienia na ten temat. Głównym punktem spornym były wyniki otrzymane przy użyciu szczepów ppGpp⁰ i pożywek o różnym składzie aminokwasów lub źródeł węgla. Teoretycznie, jeśli (p)ppGpp odpowiada za regulację przyrostu masy komórkowej, to komórki ppGpp⁰ powinny odnotowywać znacznie większy przyrost masy komórkowej (RNA i białek) niż komórki typu dzikiego, mimo podobnego czasu generacji (nie dochodzi u nich do ograniczenia syntezy rRNA i tRNA tak jak w komórkach dzikich). Wszystkie doświadczenia są wykonywane w tym przypadku w pożywkach na tyle bogatych w substraty, że nie dochodzi do ich wyczerpania i głodzenia komórek. Jedynym czynnikiem ograniczającym wzrost jest sposób wykorzystania substratów, a nie ich ilość.

Ponieważ poprzednio opublikowane przez innych badaczy doniesienia były wzajemnie sprzeczne ze sobą, należało bardzo dokładnie określić warunki hodowli szczepów ppGpp⁰. Wiadomo bowiem, że długi czas hodowli tych szczepów w pożywkach minimalnych prowadzi do powstawania spontanicznych mutacji w genach kodujących podjednostki polimerazy RNA. Takie mutanty (tzw. mutanty M+) zachowują się wtedy tak, jakby (p)ppGpp było cały czas związane z polimerazą RNA, mimo że go w komórce nie ma. Po ustaleniu warunków hodowli oraz zastosowaniu barwników fluorescencyjnych do określania poziomu RNA i DNA w komórkach, można było jednoznacznie stwierdzić, że w szczepach ppGpp⁰ przyrost masy komórkowej (RNA i białek) jest niezależny od czasu generacji i utrzymuje się na znacznie wyższym poziomie niż u szczepów dzikich. Po wykonaniu przeze mnie analizy polisomów wyizolowanych z komórek dzikich i komórek ppGpp⁰, również jednoznacznie można było

stwierdzić, że zwiększeniu ulega przede wszystkim liczba rybosomów. Ponadto, rybosomy te są w pełni dojrzałe i prawdopodobnie również w pełni funkcjonalne.

Analiza wpływu DksA pokazała ponadto, że białko to ma pewien wpływ również na przyrost masy komórkowej, jednakże tylko w warunkach wydajnej jego nadprodukcji. Stanowiło to dodatkowe potwierdzenie, że (p)ppGpp jest jedynym i wystarczającym czynnikiem odpowiedzialnym za regulację tempa przyrostu masy komórkowej.

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

- GreA jest czynnikiem transkrypcyjnym wpływającym nie tylko na elongację, ale również na inicjację transkrypcji
- GreA i DksA w wielu przypadkach działają antagonistycznie (np. przy regulacji transkrypcji zachodzącej z promotora *rrnB P1*), natomiast w niektórych warunkach działają wymiennie
- *greA* podlega autoregulacji, a transkrypcja tego genu zachodzi z dwóch zachodzących na siebie promotorów (P1, zależnego od σ^{70} , oraz P2, zależnego od σ^E)
- w rejonie promotorowym *greA* obecny jest terminator, w wyniku którego powstaje nowo wykryty sRNA- GraL
- zachodzi wzajemna regulacja między GreA, GreB i DksA na poziomie transkrypcji genów je kodujących
- GreA, GreB i DksA współzawodniczą o wiązanie do polimerazy RNA i razem z (p)ppGpp tworzą bardzo precyzyjną sieć regulującą globalne procesy komórkowe
- (p)ppGpp jest jedynym i wystarczającym czynnikiem regulującym tempo przyrostu masy komórkowej.

Wyżej wymienione rezultaty badań przyczyniły się do znacznie lepszego poznania molekularnych mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach bakteryjnych w warunkach stresu środowiskowego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Studia magisterskie rozpoczęłam na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego- Akademii Medycznej w Gdańsku w 1994 r. Natomiast badania naukowe rozpoczęłam po trzecim roku studiów pod opieką dr Sylwii Barańskiej oraz prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Zainteresowałam się wtedy dziedziną związaną z (p)ppGpp oraz wpływem odpowiedzi ścisłej i rozluźnionej na replikację plazmidu *oriJ* (praca z punktu IIA-1, załącznik 3). Wykazałam, że podobnie do plazmidów λ (plazmidy λ zawierają rejon replikacyjny bakteriofaga λ), plazmidy *oriJ* ulegają replikacji dzięki dziedzicznemu kompleksowi replikacyjnemu. W tej sytuacji, jedna kopia potomna dziedziczy wcześniej złożony kompleks replikacyjny, natomiast aby doszło do replikacji drugiej kopii musi zajść złożenie kompleksu replikacyjnego *de novo*. Istnieje jednak zasadnicza różnica między tymi dwoma typami plazmidów. Otóż mimo podobnej struktury rejonu replikacyjnego, replikacja plazmidu *oriJ* zachodzi podczas odpowiedzi ścisłej, w przeciwieństwie do plazmidów λ . Praca ta stała się podstawą mojej pracy magisterskiej, którą obroniłam w czerwcu 1999 r.

Po ukończeniu studiów, w latach 1999-2003 byłam słuchaczem Środowiskowego Studium Doktoranckiego z Biologii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Nadal kontynuowałam prace nad (p)ppGpp i replikacją plazmidów czego owocem były prace z punktu IIA-2,3,4 (załącznik 3). Wykazałam przy pomocy metody sieciowania formaldehydem *in vivo*, że w skład dziedzicznego kompleksu replikacyjnego plazmidów λ wchodzi białka λO , λP , DnaB oraz DnaK (praca IIA -2). Skład dziedzicznego kompleksu replikacyjnego nie był wcześniej poznany. Badania te stały się możliwe dzięki zastosowaniu szczepów $\Delta relA$ i prowadzeniu hodowli w warunkach głodu aminokwasowego. Nie dochodziło wtedy do składania nowych kompleksów replikacyjnych ze względu na zahamowanie syntezy białek i możliwa była analiza jedynie kompleksów wcześniej już powstałych.

Pokazałam również, że transkrypcja zachodząca z promotora λp_O ma dosyć duże znaczenie w replikacji plazmidów λ (praca IIA-3). W przypadku plazmidów posiadających mutację w tym promotorze, dochodzi do znacznie rzadszej inicjacji replikacji, czego dowodem jest obniżona liczba kopii plazmidów w komórce. Ponadto, w warunkach odpowiedzi rozluźnionej (w szczepach $\Delta relA$), gdy zachodzi replikacja jedynie z dziedzicznej kopii kompleksu replikacyjnego, w porównaniu z plazmidami typu dziekiego plazmidy λp_O^- ulegają mniej wydajnej amplifikacji. Sugeruje to, że transkrypcja zachodząca z promotora λp_O , podobnie do transkrypcji zachodzącej z promotora λp_R , jest konieczna do zmiany struktury rejonu replikacyjnego i tzw. aktywacji transkrypcyjnej rejonu *ori* λ .

Kolejna z prac dotyczyła wpływu toksyny Kid na replikację plazmidów λ i *oriJ* (praca IIA-4). Toksyna ta jest kodowana przez plazmid R1 i razem z antytoksyną Kis tworzy system mający na celu stabilne utrzymywanie plazmidów R1 w komórkach. Wcześniejsze doniesienia wskazywały, że w warunkach *in vitro* celem Kid jest inhibicja helikazy DnaB. Moje badania *in vivo* z wykorzystaniem plazmidów λ i *oriJ* pokazały, że Kid hamuje składanie *de novo* kompleksów replikacyjnych w obydwóch przypadkach. Nie ma natomiast wpływu na replikację zachodzącą przy użyciu kompleksów już złożonych (tzn. odziedziczonych przez kopię potomną plazmidu). Zakładając, że głównym celem toksyny Kid jest rzeczywiście helikaza DnaB, moje wyniki wskazują, że dziedziczny kompleks replikacyjny chroni DnaB przed wpływem Kid.

Zainteresowałam się również wpływem (p)ppGpp na transkrypcję zachodzącą z promotorów bakteriofaga λ . W tym czasie odbyłam trzy dwumiesięczne staże w laboratorium Dr V.J. Hernandez'a (State University of New York, Buffalo, USA), gdzie zdobyłam doświadczenie w metodyce transkrypcji *in vitro*.

W wyniku tej współpracy opublikowaliśmy dwie prace (punkt IIA-5,6, załącznik 3). Jedna z nich dotyczyła promotora pR bakteriofaga λ , gdzie pokazałam, iż (p)ppGpp ma wpływ na wiele etapów inicjacji transkrypcji zachodzącej z tego promotora, ale przede wszystkim na powstawanie wiązania między pierwszymi dwoma nukleotydami nowosyntetyzowanego RNA (praca IIA-5). Praca ta była też o tyle ważna, że jednoznacznie udokumentowała hamowanie inicjacji transkrypcji przez (p)ppGpp zachodzącej z promotora, na którym polimeraza RNA tworzy bardzo stabilny kompleks otwarty (czas półtrwania wynosi od pół godziny do kilku godzin, w zależności od warunków reakcji). Wcześniejsze doniesienia zdawały się sugerować, iż istnieje tylko jeden mechanizm działania (p)ppGpp, a mianowicie zmniejszanie okresu półtrwania kompleksów otwartych. Promotory na których polimeraza RNA tworzy niestabilne kompleksy otwarte miałyby być hamowane, a te które tworzą stabilne kompleksy - pośrednio aktywowane przez (p)ppGpp (hipoteza ta powstała jeszcze zanim doszło do odkrycia roli białka DksA). Jak wyżej wspomniałam, w mojej pracy pokazałam, że (p)ppGpp wpływa na

wiele etapów inicjacji transkrypcji i zasugerowałam, że wobec tego może być wiele mechanizmów za pomocą których (p)ppGpp wywołuje aktywację lub inhibicję danego promotora. Późniejsze moje prace nad innymi promotorami oraz prace innych autorów, także z użyciem białka DksA, zdają się to potwierdzać.

Postanowiłam również zbadać wpływ (p)ppGpp na transkrypcję zachodzącą z promotora paQ bakteriofaga λ (praca IIA-6, załącznik 3). Ponieważ wcześniej inni autorzy wskazali, że promotor ten ulega aktywacji przez (p)ppGpp w warunkach *in vivo*, w mojej pracy zajęłam się zbadaniem tego zjawiska *in vitro*. Praca ta stanowiła pierwszą demonstrację *in vitro* aktywacji transkrypcji przez (p)ppGpp w oczyszczonym układzie. Pokazałam, że (p)ppGpp przyspiesza zmianę konformacji kompleksu zamkniętego utworzonego przez polimerazę RNA na rejonie promotorowym, w aktywny transkrypcyjnie kompleks otwarty. Praca ta była też o tyle ważna, że udowodniła bezpośredni wpływ (p)ppGpp na aktywację promotorów. Wcześniej dosyć popularne było twierdzenie, że aktywacja transkrypcji przez (p)ppGpp jest pośrednim wynikiem inhibicji promotorów rybosomalnych (inhibicja tych promotorów miałaby prowadzić do zwiększenia puli wolnej polimerazy RNA, co pośrednio miałoby prowadzić do zwiększonej transkrypcji zachodzącej z innych promotorów).

Powyższe wyniki weszły w skład pracy doktorskiej, którą wykonałam pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna i obroniłam w listopadzie 2003 r. (tytuł pracy: „Regulacja transkrypcji i replikacji bakteriofaga λ – rola czterofosforanu guanozyny (ppGpp) w kontroli aktywności promotorów”). Po doktoracie, w grudniu 2003 r. zostałam zatrudniona na etacie adiunkta w Katedrze Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Gdańskiego. Następnie, w maju 2004 r. wyjechałam na staż naukowy do laboratorium Dr M. Cashel'a w National Institutes of Health, Bethesda, USA.

Oprócz prac wymienionych w pierwszej części autoreferatu, zajęłam się również badaniem białka o podobnej strukturze do GreA, GreB, DksA, a mianowicie TraR. Białko to jest kodowane przez plazmid F. Opracowałam metodę nadprodukcji i oczyszczania tego białka, a następnie zastosowałam je w transkrypcji *in vitro* w systemie z promotorem *rrnB P1*. TraR, podobnie do DksA, powoduje hamowanie aktywności promotorów rybosomalnych. Zaskakujące jednak było to, że nie jest wymagana obecność (p)ppGpp aby ta inhibicja zaszła. Aktywacja promotorów genów szlaków biosyntezy aminokwasów przez TraR również nie wymaga obecności (p)ppGpp (praca z punktu IIA-7, załącznik 3).

Ponadto zbadałam także regulację ekspresji genu *dksA*. Mniej więcej w tym samym czasie nasza grupa i grupa Dr T. Romeo odkryła autoregulację DksA (poprzez inhibicję *pdksA* przez DksA). Wyniki te zostały załączone do pracy z punktu IIA-8 (załącznik 3), gdzie głównym tematem jest powiązanie systemu Csr z odpowiedzią ścisłą. Mój wkład polegał również na zmapowaniu promotora *dksA*. Obserwacje te okazały się bardzo przydatne w dalszym zdefiniowaniu interakcji pomiędzy GreA, GreB, DksA i (p)ppGpp.

National Institutes of Health, w którym odbywałam staż, jest rządowym instytutem naukowym i nie kształci się tam studentów, wobec czego nie sprawowałam opieki nad studentami w tym czasie. Jednakże w końcowych latach mojego stażu stałam się jednym z najbardziej doświadczonych członków zespołu i służyłam radą nie tylko pozostałym stażystom z naszego laboratorium, ale także z laboratoriów sąsiednich. Myślę także, że poznałam znaczącą liczbę technik laboratoryjnych i nabyłam doświadczenia potrzebnego do prowadzenia własnej grupy badawczej.

K. Potrykus 5/6/12