

**„Rola wyspecjalizowanego białka kontrolującego w regulacji ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I z *Citrobacter sp.*”  
mgr Monika Rezulak**

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M) są niezwykle powszechne wśród organizmów prokariotycznych. Odgrywają kluczową rolę w horyzontalnym transferze genów modulując napływ obcego DNA do komórki bakteryjnej. Jedną z ich głównych funkcji jest ochrona komórek gospodarza przed infekcją bakteriofagową. Systemy R-M Typu II składają się z genów kodujących dwa niezależnie działające enzymy: endonukleazę restrykcyjną (REazy) i ochronną metylotransferazę DNA (MTazy). Zachwianie równowagi pomiędzy aktywnością REazy i MTazy może prowadzić do śmierci gospodarza, dlatego ekspresja genów systemów R-M musi podlegać ścisłej regulacji. Niektóre systemy R-M posiadają dodatkowy gen, który koduje czynnik transkrypcyjny C. Białko C kontroluje poziom ekspresji genów systemów R-M, wpływając także pośrednio na ich mobilność i utrzymanie się w komórce gospodarza przez wiele generacji. Celem badań w przedstawianej rozprawie doktorskiej było określenie mechanizmów molekularnych biorących udział w regulacji ekspresji genów systemu R-M Typu II Csp231I z bakterii *Citrobacter sp.* RFL231, a w szczególności zbadanie funkcji białka regulatorowego z nowej, niebadanej szerzej rodziny regulatorów C.EcoO109-podobnych. W badanym systemie R-M Csp231I, podobnie jak w innych systemach R-M, których ekspresja genów zależy od białka C, produkowany jest wspólny transkrypt genów regulatora C i REazy. Regulator C ma aktywność represora własnej transkrypcji poprzez mechanizm biologicznego sprzężenia zwrotnego, gdzie białko C wiąże się do tzw. sekwencji C-box umieszczonej w rejonie własnego promotora. Efekt aktywacji, bądź represji transkrypcji zależy od stężenia regulatora C w komórce, ale w szerszym zakresie występuje hamowanie transkrypcji. Nietypowo do większości badanych systemów R-M, większość transkryptu REazy wytwarzana jest z własnego tandemu promotorów, a nie z promotora regulatora C. Białko C tylko częściowo kontroluje ekspresję genu REazy poprzez bicistronowy transkrypt, ale jego obecność znacząco wpływa na redukcję poziomu relatywnej restrykcji systemu R-M i efektywność transformacji do komórek bakteryjnych. Dalsze badania wykazały, że poziom transkryptu genu C jest negatywnie regulowany przez antysensowny RNA kodowany na nici dolnej w obrębie genu C. Zwiększenie ilości transkryptu C na skutek inaktywacji promotora, który wytwarza antysensowny RNA prowadzi do znacznego zmniejszenia poziomu mRNA REazy, czego skutkiem jest

zaobserwowany zmniejszony poziom relatywnej restrykcji. Zakłócenie regulacji ekspresji genów systemu R-M poprzez brak syntezy antysensownego RNA lub delecję całego genu C powoduje, że nie jest on stabilnie dziedziczony w kolejnych pokoleniach, niezależnie od poziomu relatywnej restrykcji. Te obserwacje mogą wnieść nowe spojrzenie na mechanizmy, które uzależniają komórki bakteryjne od występujących w nich samolubnych elementów genetycznych. W pracy zaproponowano przypuszczalny mechanizm regulacji ekspresji genów systemu R-M Csp231I, w którym bierze udział nie tylko białko C jako czynnik transkrypcyjny, ale też jego mRNA jako regulator. Przypuszczalne oddziaływanie RNA::RNA na poziomie po-transkrypcyjnym mogą wpływać bezpośrednio na poziom ekspresji REazy. Obecność skomplikowanych wielowarstwowych mechanizmów regulatorowych nie jest zaskakująca, gdyż systemy R-M, tak jak inne systemy toksyna-antytoksyna, wymagają bardzo precyzyjnego kontrolowania swoich aktywności, tak by uniknąć uśmiercenia swojego bakteryjnego gospodarza na etapie wprowadzanie swoich genów na drodze horyzontalnego transferu, ale także podczas utrzymywania się w komórce.