

# **AUTOREFERAT**

**Dr Monika Słomińska-Wojewódzka**

Katedra Biologii Molekularnej

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2015

**1. Imię i nazwisko**

Monika Słomińska-Wojewódzka

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej****16.05.2003 stopień doktora nauk biologicznych w dziedzinie biologii**

Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego (obecnie Wydział Biologii)

Promotor: Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola białka SeqA w regulacji replikacji, transkrypcji i rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ ”

Praca doktorska została wyróżniona nagrodą Prezesa Rady Ministrów w 2004 roku

**25.06.1998 tytuł magistra biotechnologii**

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

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

**1.10.2003 do chwili obecnej** - adiunkt w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego

**18.02.2013 - 16.02.2014** - urlop macierzyński i rodzicielski

**14.06.2007 - 13.10.2007** - urlop macierzyński

**1.11.2003 - 30.11.2005** - staż podoktorski w laboratorium Prof. Kirsten Sandvig, Department of Biochemistry, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norwegia. **Stypendystka Europejskiej Fundacji Biologii Molekularnej EMBO (EMBO long-term fellowship)**

**1.10.1998 - 16.05.2003** - słuchaczka Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego

**1.01.2002 - 31.06.2002** - staż naukowy w laboratorium Prof. Kirsten Skarstad, Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norwegia oraz w laboratorium Prof. Andersa Løbner-Olesen, Department of Microbiology, Technical University of Denmark, Lyngby, Dania. **Stypendystka Europejskiej Fundacji Naukowej (ESF fellowship)**

**1.06.2000 - 31.08.2000** - staż naukowy w laboratorium Prof. Kirsten Skarstad, Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norwegia. **Stypendystka Europejskiej Fundacji Biologii Molekularnej (EMBO short-term fellowship)**

**1.10.1998 - 30.09.1999** - asystent w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego

**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/artystycznego**

Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny stanowi monotematyczny cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych oraz jednej pracy przeglądowej pod tytułem:

**„Specyficzność substratowa białek opiekuńczych retikulum endoplazmatycznego EDEM1 i EDEM2 oraz ich rola w transporcie wewnątrzkomórkowym rycyny”.**

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

1. **Słomińska-Wojewódzka M.,\*** Gregers T.G.,\* Wälchli S., Sandvig K. (2006). EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Mol. Biol. Cell*, 17: 1664-1675.  
**\*autorzy równorzędni**, (IF<sub>2006</sub>: 6,56; pkt. MNiSW<sub>2014</sub> = 30)
2. Sokołowska I., Wälchli S, Węgrzyn G., Sandvig K., **Słomińska-Wojewódzka M.\*** (2011). A single point mutation in ricin A-chain increases toxin degradation and abrogates EDEM1-dependent ER retrotranslocation. *Biochem. J.*, 436: 371-385.  
**\*autor korespondujący**, (IF<sub>2011</sub> = 4,89; pkt. MNiSW<sub>2014</sub> = 35)
3. **Słomińska-Wojewódzka M.,\*** Sandvig K. (2013). Ricin and ricin-containing immunotoxins: insights into intracellular transport and mechanism of action *in vitro*. *Antibodies*, 2: 236-269.  
**\*autor korespondujący**, (IF<sub>2013</sub> = bez IF, pkt. MNiSW<sub>2014</sub> = bez punktów)
4. **Słomińska-Wojewódzka M.,\*** Pawlik A., Sokołowska I., Antoniewicz J., Węgrzyn G., Sandvig K. (2014). EDEM2 compared with EDEM1 in ricin transport from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem. J.*, 457: 485-496.  
**\*autor korespondujący**, (IF<sub>2014</sub> = 4,77, pkt. MNiSW<sub>2014</sub> = 35)
5. Sokołowska I., Piłka E.S., Sandvig K., Węgrzyn G., **Słomińska-Wojewódzka M.\*** (2015). Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells. *BMC Cell Biology*, DOI 10.1186/s12860-015-0047-7.  
**\*autor korespondujący**, (IF<sub>2014</sub> = 2,84, pkt. MNiSW<sub>2014</sub> = 25)

Sumaryczny IF = 19,06. Liczba cytowań tych prac to 62, w tym 60 bez autocytowań (dane wg. bazy Web of Science).

**C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Celem naukowym prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było poznanie dokładnych mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego rycyny, w tym podjednostki A tej toksyny z retikulum endoplazmatycznego (ER) do cytozolu, ze szczególnym uwzględnieniem roli retikularnych białek opiekuńczych EDEM1 i EDEM2. Istotną również była charakterystyka sposobów rozpoznawania substratów białkowych przez glikoproteiny z rodziny EDEM.

Rycyna to toksyna pochodzenia roślinnego izolowana z nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis*). Składa się ona z dwóch łańcuchów polipeptydowych A i B, połączonych mostkiem dwusiarczkowym i tworzących tzw. holotoksynę. Enzymatycznie aktywny łańcuch A (RTA) odpowiada za blokowanie syntezy białek; łańcuch B (RTB), o właściwościach lektyny, wiąże się do komórkowych receptorów powierzchniowych zawierających terminalną  $\beta$ -1,4-galaktozę. Po związaniu z powierzchnią komórki toksyna ulega endocytozie i jest kierowana do wczesnych endosomów. Stąd większość rycyny jest transportowana z powrotem na powierzchnię komórki lub dostarczana do późnych endosomów, a następnie do lizosomów, gdzie ulega proteolitycznej degradacji. Około 5% rycyny, która uległa endocytozie jest jednak transportowane do aparatu Golgiego, a następnie do retikulum endoplazmatycznego (ER). W ER toksyna ulega redukcji, a enzymatycznie aktywna podjednostka A jest transportowana do cytozolu. Podjednostka A rycyny jest *N*-glikozydazą RNA należącą do dużej rodziny białek RIP (ang. *ribosome-inactivating proteins*), które hamują działanie eukariotycznych rybosomów, a tym samym syntezę białek. Jej działanie polega na usuwaniu specyficznej reszty adeniny z ewolucyjnie konserwowanego regionu 28S RNA dużej podjednostki rybosomalnej. Rejon ten tworzy charakterystyczną pętlę, stanowiącą integralną część sekwencji rozpoznawanej przez kompleks czynników translacyjnych eEF-1/EF-Tu i eEF-2/EF-G. Depurynacja RNA uniemożliwia wiązanie wspomnianych czynników elongacyjnych, a rybosomy zawierające zmodyfikowany 28S RNA nie mogą uczestniczyć w procesie syntezy białek. Działanie podjednostki A rycyny jest bardzo efektywne, w ciągu minuty może ona inaktywować nawet dwa tysiące rybosomów. Dawka śmiertelna dla człowieka wynosi zaledwie 3  $\mu$ g na 1 kg wagi ciała. Szybkość działania rycyny, jej wysoka stabilność, łatwa produkcja oraz relatywnie wysoka dostępność czynią ją jedną z najbardziej niebezpiecznych wśród istniejących toksyn (poziom B zagrożenia, wg. Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom, agencji rządu federalnego Stanów Zjednoczonych). Z drugiej strony, toksyna ta stanowi świetny obiekt badań biologii komórki oraz biochemii białek. Poznanie dokładnych mechanizmów transportu rycyny w komórce jest niezwykle istotne z punktu widzenia wykorzystania jej w terapii anty-nowotworowej, w tym konstrukcji nowoczesnych immunotoksyn. Istotne jest również opracowanie skutecznej metody inaktywacji rycyny, która dostała się do organizmu człowieka. Nabiera to szczególnego znaczenia w dzisiejszych czasach, kiedy wzrasta zainteresowanie produkcją i wykorzystaniem broni biologicznej.

Szorstkie retikulum endoplazmatyczne jest wysoce wyspecjalizowanym organellum komórki eukariotycznej odpowiedzialnym za syntezę i prawidłowe fałdowanie białek lizosomalnych, błonowych, a także wydzielanych na zewnątrz komórki. Określone modyfikacje ko-translacyjne i post-translacyjne białek, takie jak formowanie mostków dwusiarczkowych, specyficzne cięcia proteolityczne czy wstępne etapy *N*-glikozylacji zachodzą specyficznie w ER i nie występują w cytozolu. Ze względu na pełnione funkcje ER posiada szereg białek opiekuńczych, które zapobiegają agregacji niedojrzałych glikoprotein, jak również uczestniczą bezpośrednio w poprawnym fałdowaniu i oligomeryzacji substratów białkowych. W ER występują również foldazy, do których należą enzymy z rodziny izomeraz peptydylo-dwusiarczkowych (ang. *PDI - protein disulphide isomerase*), a także izomerazy

cis-trans peptydylo-proliłowe. Obok klasycznych białek opiekuńczych i foldaz bardzo ważną rolę w prawidłowym fałdowaniu białek w ER odgrywają lektyny, które rozpoznają łańcuchy cukrowe glikozylowanych substratów. N-glikozylacja polega na przyłączaniu do białek wchodzących do światła ER łańcuchów oligosacharydowych, składających się z dwóch reszt N-acetyloglukozaminy, dziewięciu reszt mannozy i trzech reszt glukozy ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ). Po dodaniu łańcucha oligosacharydowego rozpoczyna się etap jego obróbki. Usunięcie dwóch pierwszych reszt glukozy przez glukozydazę I i II umożliwia oddziaływanie glikoproteiny z lektynami odpowiedzialnymi za prawidłowe fałdowanie białek - kalneksyną i kalretikulina. Kalneksyna jest białkiem błonowym, natomiast homologiczna kalretikulina jest rozpuszczalnym białkiem światła ER. Obie lektyny posiadają domenę wykazującą powinowactwo do monoglikozylowanych glikoprotein, a także oddziałują z oksydoreduktazą ERp57, należącą do rodziny białkowych izomeraz peptydylo-disiarczkowych. ERp57 przyspiesza fałdowanie białek przez katalizowanie wytwarzania poprawnych mostków disiarczkowych, co jest niezwykle ważne dla zachowania stabilności glikoprotein. Odcięcie terminalnej glukozy przez glukozydazę II przerywa cykl fałdowania glikoprotein związanych z kalneksyną i kalretikulina, a białka, które posiadają prawidłową konformację kierowane są dalej do miejsc swojego przeznaczenia. W przeciwieństwie do nich, glikoproteiny, które nie osiągnęły natywnej struktury, oddziałują z UDP-glukoza:glikoproteino glukozylotransferazą (UGGT) katalizującą ponowne przyłączenie terminalnej glukozy. W konsekwencji umożliwia to powtórne oddziaływanie nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein z kalneksyną i kalretikulina, co znacznie zwiększa szanse na osiągnięcie przez nie poprawnej struktury. Jeśli jednak białka dojrzewające w ER nie osiągnęły prawidłowej konformacji, to są one wówczas specyficznym rozpoznawane przez inne, charakterystycznie działające białka opiekuńcze, lektyny z rodziny EDEM (ang. *ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like proteins*): EDEM1, EDEM2 i EDEM3. Wewnątrzkomórkowy poziom homologów EDEM wzrasta podczas stresu retikularnego, którego bezpośrednią przyczyną jest nadmierne gromadzenie się w ER białek o nieprawidłowej konformacji. Odpowiedzią na zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy jest indukcja szlaku Ire1/Xbp1 będącego częścią mechanizmu zwanego odpowiedzią na nieprawidłowo sfałdowane białka (ang. *UPR - unfolded protein response*). Potwierdzono eksperymentalnie, iż nadprodukcja białek EDEM1 i EDEM2 przyspiesza degradację glikoprotein o nieprawidłowej konformacji; natomiast przy obniżonym wewnątrzkomórkowym poziomie białek EDEM obserwowano efekt przeciwny - akumulację nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein w ER. Wiadomo, że EDEM1 i EDEM2 rozpoznają nieprawidłowo sfałdowane białka i kierują je do kanałów błonowych ER. Jest to pierwszy etap procesu ERAD (ang. *ER-associated degradation*), który jest częścią wyspecjalizowanego systemu kontroli jakości fałdowania białek w ER i polega na rozpoznaniu i kierowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek retikularnych do cytozolu, gdzie są ostatecznie poddawane ubikwityno-zależnej proteolizie prowadzonej przez proteasomy. Najlepiej poznanym do tej pory kanałem błonowym ER jest heteromeryczny kompleks białkowy Sec61p, którego głównym komponentem jest Sec61 $\alpha$ . Udowodniono, że za pośrednictwem tego kanału odbywa się ko-translacyjne wprowadzanie białek do

ER. Kanał ten jest też wykorzystywany w procesie ERAD. Drugim potencjalnym kanałem błonowym zaangażowanym w retrotranslokację substratów białkowych do cytozolu jest kanał zbudowany z kompleksu białek Derlin.

Badania prowadzone w ostatnich kilkunastu latach pokazały, że rycyna oddziałuje z kalretikulina, a także białkiem Sec61 $\alpha$ , co mogło sugerować, że wykorzystuje ona system kontroli jakości fałdowania białek, a w szczególności proces ERAD w swojej translokacji do cytozolu. Rycyna nie jest jednak typowym substratem tego procesu, gdyż nie jest transportowana do cytozolu w celu proteolitycznej degradacji. Wyjaśnianie molekularnych mechanizmów transportu podjednostki A rycyny do cytozolu oraz udziału białek systemu ERAD w tym procesie stało się bardzo ważnym zagadnieniem, mającym istotne znaczenie w charakterystyce toksyczności rycyny, a także w lepszym zrozumieniu ogólnych zasad rozpoznawania substratów białkowych kierowanych na drodze retrotranslokacji do cytozolu. Wyjaśnienie tych procesów ma potencjalnie bardzo duże znaczenie w opracowaniu nowych strategii walki m.in. z chorobami nowotworowymi czy neurodegeneracyjnymi, co zostanie wyjaśnione w dalszej części autoprezentacji.

Pierwszy etap moich badań związany był z obserwacją, że w ludzkich embrionalnych komórkach nerkowych, HEK293 (ang. *human embryonic kidney*) podczas nadprodukcji białka EDEM1 występuje znaczny, około 4-krotny spadek cytotoxyczności rycyny (Słomińska-Wojewódzka i wsp., 2006). Eksperymenty przeprowadzone z użyciem inhibitora proteasomu laktacystyny, jak również testy badania redukcji holotoksyny rycyny w ER wykazały, że obniżenie cytotoxyczności tej toksyny nie było związane ze zwiększoną proteasomalną degradacją podjednostki A w cytozolu ani też ze zmienioną redukcją holotoksyny w ER. W dalszej części badań konieczne było określenie stopnia retrotranslokacji podjednostki A rycyny z ER do cytozolu. Rycyna używana w naszych eksperymentach ulega sulfatacji w cysternach aparatu Golgiego, skąd transportowana jest do ER. Możliwe jest zatem specyficzne radioaktywne wyznaczenie rycyny za pomocą  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , wybiórcza permeabilizacja błony komórkowej przy zastosowaniu detergentu digitoniny, a następnie oddzielenie frakcji cytozolowej od membranowej, która zawiera m.in. nienaruszone ER (integralność błon ER potwierdzona została w licznych testach kontrolnych). Wyniki eksperymentów pokazały, że w komórkach nadprodukcujących białko EDEM1 frakcja cytozolowa zawiera około 3-krotnie mniejszą ilość RTA w porównaniu do komórek kontrolnych. Możliwa interpretacja tego wyniku zakładała, że nadprodukcja EDEM1 podwyższa ogólny transport nieprawidłowo sfałdowanych białek przez kanały ER, blokując w ten sposób ich dostępność dla rycyny. W celu weryfikacji tej hipotezy wykonano eksperymenty badania transportu podjednostki A rycyny do cytozolu w komórkach nadprodukcujących modelowe niesfałdowane białka. Okazało się, że podwyższony poziom ERAD blokuje dostępność kanałów ER dla podjednostki A rycyny obniżając jej transport do cytozolu. Można było zatem założyć, że jeśli obniżony zostanie ogólny transport białek przez kanały ER, to wtedy możliwe będzie oznaczenie faktycznego wpływu nadprodukcji EDEM1 na translokację RTA do cytozolu. Kolejne eksperymenty pokazały, że w komórkach traktowanych puromycyną, która jest inhibitorem syntezy białek, jak również kifunenzyną, blokującą oddziaływanie

między EDEM1 a nieprawidłowo sfałdowanymi białkami, wzrasta transport RTA do cytozolu. Co istotne jednak, wzrost ten jest dużo większy w komórkach nadprodukujących EDEM1 w porównaniu do komórek posiadających fizjologiczny poziom tego białka. Oznacza to, że białko EDEM1 może podwyższać transport rycyny do cytozolu przy braku indukcji procesu ERAD. Hipoteza ta została poparta wynikami eksperymentów wykonanych z wykorzystaniem komórek transferowanych siRNA typu wektorowego, posiadających obniżony poziom białka EDEM1. Pokazały one ponad dwukrotne obniżenie transportu RTA do cytozolu w porównaniu do komórek transferowanych wektorem kontrolnym. W celu potwierdzenia istotnej roli EDEM1 w transporcie podjednostki A rycyny do cytozolu wykonane zostały testy ko-immunoprecypitacji, które pokazały, że rycyna oddziałuje z EDEM1, a poziom tych oddziaływań jest wyższy w komórkach traktowanych kifunenzyną lub puromycyną. Testy ko-immunoprecypitacji wykazały również, że nadprodukcja EDEM1 obniża oddziaływanie między rycyną a białkiem translokony Sec61 $\alpha$ . Obniżenie poziomu transportu substratów białkowych przez kanały ER w komórkach nadprodukujących EDEM1 wiązało się jednak z podwyższeniem oddziaływań między rycyną a Sec61 $\alpha$ . Podsumowując, białko EDEM1 może podwyższać transport podjednostki A rycyny do cytozolu, a oddziaływanie między rycyną a EDEM1 pełni prawdopodobnie bardzo istotną rolę w kierowaniu RTA do kanałów błonowych Sec61p.

Dalsze prace eksperymentalne pokazały, że białko EDEM2 jest również istotne w transporcie RTA do cytozolu, różni się jednak w swoim działaniu od białka EDEM1 (**Słomińska-Wojewódzka i wsp., 2014**). Wyniki badań cytotoksyczności rycyny przeprowadzone w komórkach nadprodukujących EDEM2 wykazały około 3-krotny wzrost wrażliwości komórek HEK293 na działanie rycyny. Wzrost ten nie był spowodowany obniżoną proteasomalną degradacją podjednostki A rycyny w cytozolu ani też zmienioną redukcją holotoksyny w ER. W zestawieniu z wynikami obniżonej cytotoksyczności rycyny w komórkach nadprodukujących EDEM1 (**Słomińska-Wojewódzka i wsp., 2006**) można było wstępnie założyć, że EDEM2 w sposób bezpośredni wzmacnia efekt cytotoksyczności rycyny. Badania translokacji RTA do cytozolu potwierdziły tę hipotezę, wskazując na znaczące podwyższenie transportu podjednostki A do cytozolu w komórkach nadprodukujących EDEM2. Należy przy tym zauważyć, że nadprodukcja EDEM2, podobnie jak EDEM1, wzmacnia proces ERAD, a tym samym podwyższa transport nieprawidłowo sfałdowanych białek przez kanały ER. W przeciwieństwie do komórek nadprodukujących EDEM1, nie wpłynęło to jednak na ograniczenie dostępności kanałów błonowych ER dla rycyny. Co więcej, obniżenie transportu białek przez kanały ER przy zastosowaniu odpowiednich inhibitorów (puromycyny, cykloheksamidu i kifunenzyny) nie skutkowało znaczącym wzmocnieniem EDEM2-zależnej translokacji podjednostki A do cytozolu. Ponadto jednoczesna nadprodukcja EDEM1 i EDEM2 wiązała się ze wzrostem transportu RTA do cytozolu w porównaniu z komórkami kontrolnymi, ale wzrost ten był niższy niż w komórkach nadprodukujących jedynie białko EDEM2. Ma to zapewne związek z różną dostępnością kanałów błonowych dla rycyny. Wyniki tych eksperymentów wskazują zatem, że w przeciwieństwie do białka EDEM1, EDEM2 podwyższa transport RTA przez kanały ER niezależnie od transportu innych substratów białkowych przez te same kanały. W

celu obniżenia ilości białka EDEM2 w komórce, a także jednoczesnej redukcji EDEM2 i EDEM1 zastosowane zostały siRNA typu esiRNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz siRNA typu wektorowego. Spadek poziomu EDEM2 skutkował wyraźnym obniżeniem transportu RTA do cytozolu, który był dodatkowo zredukowany przy jednoczesnym obniżeniu poziomu białek EDEM1 i EDEM2. Wyniki eksperymentów opisanych powyżej pozwoliły na postawienie wstępnej hipotezy mówiącej o tym, że sposób oddziaływań białek EDEM1 i EDEM2 z RTA może różnić się znacząco. Dalsze badania wykazały, że zarówno EDEM1 jak i EDEM2 oddziałują z RTA, co zostało potwierdzone w testach *in vitro* typu „pull-down” jak też w testach ko-immunoprecypitacji, jednak EDEM2 oddziałuje z RTA dużo silniej niż EDEM1. Przyjęto hipotezę zakładającą, że EDEM1 wykazuje większe powinowactwo do nieprawidłowo sfałdowanych białek niż do podjednostki A rycyny, EDEM2 natomiast rozpoznaje RTA w sposób podobny do klasycznych substratów procesu ERAD. Jest to pierwsza tego typu obserwacja dotycząca różnic substratowych białek EDEM1 i EDEM2.

Podjednostka A rycyny na swoim C-terminalnym końcu posiada wysoce hydrofobowy fragment zbudowany z 12 reszt aminokwasowych, położony między Val245 a Val256. W holotoksynie rycyny region ten jest ukryty w głębi struktury i pozostaje niedostępny dla wszelkich oddziaływań międzybiałkowych. Jednak po redukcji rycyny w ER fragment ten staje się wyeksponowany i może uczestniczyć w oddziaływaniach z innymi białkami. Wyniki opublikowanych wcześniej badań dowiodły, że region ten odgrywa kluczową rolę w cytotoxycywności rycyny. Istotna jest zwłaszcza prolina położona w pozycji 250 (P250). Mutacja tego miejsca polegająca na zastąpieniu proliny przez alaninę (P250A) wykazała znaczną redukcję cytotoxycywności tak zmienionej rycyny w komórkach Vero (ang. *African green monkey kidney cells*) w porównaniu z działaniem toksyny dzikiego typu.

Celem eksperymentów opublikowanych w pracy **Sokolowska i wsp., 2011** było zbadanie potencjalnej roli rejonu hydrofobowego podjednostki A rycyny w jej transporcie z ER do cytozolu oraz poznanie roli tego regionu w oddziaływaniach między RTA a białkami z rodziny EDEM. Mutacja P250A została wprowadzona do fragmentu genu kodującego C-terminalny fragment przy użyciu mutageny miejscowo-specyficznej, a otrzymaną RTA<sub>P250A</sub> oczyszczono na drodze chromatografii powinowactwa i zasocjowano z podjednostką B, tworząc holotoksynę RTA<sub>P250A</sub>:RTB. Eksperymenty kontrolne wykazały, że otrzymana holotoksyna jest poprawnie sfałdowana oraz posiada funkcjonalny mostek dwusiarczkowy, który może ulegać redukcji. Stabilność zmodyfikowanej rycyny nie odbiegała od stabilności rycyny dzikiego typu. Eksperymenty przeprowadzone w komórkach Vero oraz HEK293 pokazały około 9-krotne obniżenie cytotoxycywności rycyny niosącej mutację w podjednostce A w porównaniu do rycyny dzikiego typu. Obniżenie cytotoxycywności nie było związane z jakąkolwiek zmianą w proteosomalnej degradacji tej zmienionej holotoksyny. Wyniki naszych eksperymentów pokazały natomiast, że wewnątrzkomórkowy poziom rycyny RTA<sub>P250A</sub>:RTB jest 3-krotnie obniżony w porównaniu do rycyny dzikiego typu. Dalsze badania przeprowadzone z wykorzystaniem toksyny znakowanej radioaktywnie za pomocą <sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> wykazały obniżoną ilość zmodyfikowanej rycyny docierającej do aparatu Golgiego, przy czym zmiana ta nie była wynikiem obniżonego wiązania tej



toksyny do powierzchni komórki ani też jej zmienionej endocytozy. Kolejne eksperymenty zostały wykonane z zastosowaniem inhibitorów wakuolarnych  $H^+$ -ATPaz oraz endosomalno-lizosomalnych proteaz: katepsyny D i katepsyny B. Zajęliśmy się także badaniem transportu rycyny znakowanej radioaktywnym jodem [ $^{125}I$ ] z endosomów na powierzchnię komórki. Wyniki tych eksperymentów pokazały, że rycyna posiadająca mutację P250A w podjednostce A ulega 3-krotnie zwiększonej degradacji zachodzącej w endosomach. Jest to niewątpliwie przyczyną obniżenia poziomu zmodyfikowanej holotoksyny w aparacie Golgiego; fakt ten również częściowo tłumaczy obniżoną cytotoksyczność rycyny RTA<sub>P250A</sub>:RTB. Za obniżoną cytotoksyczność zmienionej rycyny odpowiada również około 3-krotna redukcja transportu podjednostki A z ER do cytozolu. Co ciekawe, transport ten jest całkowicie niezależny od białek EDEM1 (**Sokołowska i wsp., 2011**) oraz EDEM2 (**Słomińska-Wojewódzka i wsp., 2014**). Wynika to z faktu, że oba białka EDEM dużo słabiej rozpoznają RTA<sub>P250A</sub> w porównaniu z podjednostką A rycyny dzikiego typu. Doświadczenia dichroizmu kołowego pokazały, że zmodyfikowana RTA posiada zmienioną strukturę drugorzędową charakteryzującą się podwyższoną ilością  $\alpha$ -helis i zredukowaną ilością  $\beta$ -harmonijek. Można zatem wnioskować, że struktura substratu białkowego ma zasadnicze znaczenie w jego rozpoznawaniu przez retikularne białka opiekuńcze EDEM1 i EDEM2.

Poznanie dokładnych mechanizmów regulujących proces rozpoznawania i degradacji nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein jest jednym z najbardziej ciekawych i ważnych zagadnień dotyczących funkcjonowania retikulum endoplazmatycznego. Od dawna wiadomo było, że białka z rodziny EDEM rozpoznają reszty cukrowe glikoprotein, co wiąże się niewątpliwie z ich enzymatyczną aktywnością  $\alpha$ -mannozydaz. Aktywność ta polega na usuwaniu reszty mannozy z rdzeni N-glikanów, co jak przypuszcza się, ma zasadnicze znaczenie w kierowaniu glikoprotein na drogę degradacji. Poza tym wiadomo, że białka z rodziny EDEM rozpoznają determinanty białkowe obecne w łańcuchach polipeptydowych. Jednym z dowodów potwierdzających tę obserwację jest używana w naszych badaniach rycyna, która jako białko rekombinowane, produkowane w *E. coli* nie ulega glikozylacji. Opisane do tej pory w autoreferacie badania dowiodły, że w rozpoznawaniu substratów przez białka z rodziny EDEM istotna jest odpowiednia struktura substratu białkowego oraz, że EDEM1 i EDEM2 mogą rozpoznawać struktury rejonów hydrofobowych innych białek (**Sokołowska i wsp., 2011**; **Słomińska-Wojewódzka i wsp., 2014**). Dalsze eksperymenty miały na celu potwierdzenie roli rejonów hydrofobowych białek w ich rozpoznawaniu przez EDEM1 i EDEM2, jak również odpowiedź na pytanie, czy stopień hydrofobowości tych rejonów jest istotny dla specyficzności substratowej białek z rodziny EDEM (**Sokołowska i wsp., 2015**). Mutageneza miejscowo-specyficzna rejonu hydrofobowego podjednostki A rycyny pozwoliła na skonstruowanie formy zmodyfikowanej RTA z obniżoną (RTA<sub>DHF</sub>) i podwyższoną hydrofobowością (RTA<sub>IHF</sub>) tego regionu. RTA<sub>DHF</sub> posiadająca substytucje V245S, L248N, I252N, A253S oraz RTA<sub>IHF</sub> ze zmianami S246V, A253V zostały zasocjowane z podjednostką B rycyny. Eksperymenty kontrolne wykazały, że wprowadzone mutacje nie wpłynęły na stabilność otrzymanych form holotoksyny ani też na redukcję ich mostków dwusiarczkowych, nie zmieniły także

struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej zmodyfikowanych podjednostek A. Było to bardzo istotne, gdyż nadrzędnym celem naszych eksperymentów było zbadanie tylko i wyłącznie wpływu zmian stopnia hydrofobowości substratów białkowych na ich rozpoznawanie przez EDEM1 i EDEM2. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że znaczne obniżenie hydrofobowości rejonu C-terminalnego RTA ma zasadniczy wpływ na redukcję oddziaływań między RTA a białkami EDEM1 i EDEM2. Z drugiej strony, podwyższenie hydrofobowości i tak wysoce już hydrofobowego rejonu nie wpłynęło na oddziaływania z białkami z rodziny EDEM. Można zatem wnioskować, że odpowiednio wysoki stopień hydrofobowości substratów białkowych ma bardzo istotne znaczenie w ich rozpoznawaniu przez EDEM1 i EDEM2. Dla poparcia tej hipotezy, w dalszej części badań została użyta odpowiednio zmodyfikowana forma modelowego nieprawidłowo sfałdowanego białka BACE457. Białko to jest formą trzustkowej  $\beta$ -sekreazy. Ludzka mózgową  $\beta$ -sekreaza składająca się z 501 reszt aminokwasowych (BACE501) jest błonową proteazą aspartylową odpowiedzialną za przecinanie białka prekursorowego amyloidu APP do formy, z której generowany jest później peptyd  $\beta$ -amyloidowy. Trzustkowa forma BACE457 jest izoformą powstałą w wyniku alternatywnego składu BACE501, krótszą od formy mózgowej o 44 reszty aminokwasowe. W przeciwieństwie do BACE501, forma BACE457 nie przyczynia się do powstawiania  $\beta$ -amyloidów, a jej funkcja nie jest do końca poznana. BACE457 nie ulega prawidłowemu sfałdowaniu w ER, oddziałuje z EDEM1 i jest następnie usuwane do cytozolu w celu proteolitycznej degradacji, jako typowy substrat procesu ERAD. Białko to posiada na swoim C-terminalnym końcu transbłonowy rejon hydrofobowy (Ile458-Val477), który może być potencjalnym miejscem oddziaływań z białkami z rodziny EDEM. Wyniki przeprowadzonych przez nas eksperymentów pokazały, że zmodyfikowane białko BACE457 (określone w pracy jako BACE457<sub>DHF</sub>), posiadające zmiany obniżające jego hydrofobowość (V417G, L424G, L427G) jest znacznie słabiej rozpoznawane przez EDEM1 i EDEM2 w porównaniu z niezmodyfikowanym BACE457. Wyniki te są zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami i podkreślają znaczenie wysokiej hydrofobowości rejonów białkowych rozpoznawanych przez białka z rodziny EDEM. EDEM1 i EDEM2 mogą rozpoznawać wyeksponowane rejony hydrofobowe, ale też rejony transbłonowe białek. Oznacza to, że oprócz typowego działania charakterystycznego dla lektyn, białka EDEM rozpoznają substraty białkowe w sposób podobny do klasycznych białek opiekuńczych. Ma to wpływ na degradację białek. Wyniki naszych eksperymentów pokazały, że BACE457<sub>DHF</sub> jest białkiem charakteryzującym się dużo większą stabilnością w porównaniu z BACE457. Są to pierwsze tego typu opublikowane informacje, które mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia podstaw procesu ERAD.

Proces rozpoznawania i degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek w ER ma niebagatelne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu każdej komórki eukariotycznej. Zaburzenia tego procesu prowadzą do stresu retikularnego, który jest wynikiem nadmiernego gromadzenia się białek w ER. Komórka nie jest wówczas w stanie produkować bardzo ważnych dla swojego działania glikoprotein; chociażby białek sekrecyjnych, niezbędnych także w prawidłowym funkcjonowaniu całego organizmu. Stres retikularny prowadzi do włączenia odpowiedzi komórkowej na nieprawidłowo sfałdowane białka.

Jednak mimo jej istnienia bardzo wiele komórek poddanych długotrwałemu stresowi retikulumu ulega apoptozie. Znalaziono szereg zależności między nieprawidłowym funkcjonowaniem białek opiekuńczych ER a chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera i Parkinsona, rozwojem różnego rodzaju nowotworów, cukrzycą, miażdżycą czy patogenezą chorób spowodowanych przez bakterie. Białka opiekuńcze ER odgrywają również zasadniczą rolę w rozwoju embrionalnym organizmów. Dokładne poznanie mechanizmów procesu degradacji substratów białkowych oraz roli białek EDEM w tym procesie ma zatem niebagatelne znaczenie poznawcze, umożliwiające praktyczne wykorzystanie otrzymanych wyników w przyszłości. Wyniki moich prac mogą znacząco przyczynić się do poszerzenia wiedzy o funkcjonowaniu procesu kontroli jakości fałdowania białek w ER oraz do lepszego poznania mechanizmów transportu i degradacji nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein.

Ewentualne praktyczne wykorzystanie wyników moich prac ma również związek z produkcją efektywnie działających immunotoksyn, zawierających w swoim składzie rycynę (**Słomińska-Wojewódzka i Sandvig, 2013**). Immunotoksyny zbudowane są z przeciwciała monoklonalnego lub jego części sprzężonego z całą toksyną bądź też jej fragmentem, bardzo często z RTA. Takie połączenie zapewnia silne toksyczne działanie anty-nowotworowe zależne od toksyny oraz specyficzność działania uwarunkowaną doбором odpowiedniego przeciwciała, określonego dla danego antygeny powierzchniowego komórki nowotworowej. Generalnie uważa się, że RTA może działać dużo bardziej toksycznie na komórki nowotworowe niż na komórki zdrowe. Niestety, mimo wielkich nadziei i oczekiwań związanych z produkcją immunotoksyn zawierających rycynę i inne podobnie działające toksyny, nie są one masowo wykorzystywane. Wynika to z występowania tzw. zespołu przeziąkania naczyniowego (ang. *vascular leaks syndrome*, VLS). Charakteryzuje się on zwiększoną przepuszczalnością naczyń spowodowaną uszkodzeniem i śmiercią komórek śródbłonna. Za efekt ten bezpośrednio odpowiadają toksyny, w tym rycyna. Nie wiadomo jednak czy proces ten związany jest bezpośrednio z zahamowaniem syntezy białek wywołanym przez rycynę czy też raczej z indukcją procesu apoptozy. Uważa się zatem, że w skład immunotoksyn nowej generacji powinna wchodzić znacznie mniej toksyczna forma RTA. Z drugiej jednak strony, jej cytotoksyczność powinna być odpowiednia do niszczenia komórek nowotworowych. Z tego względu interesująca jest badana przeze mnie rycyna niosąca mutację w rejonie hydrofobowym RTA (P250A), która ma znacząco obniżoną cytotoksyczność. Wyniki naszych badań pokazują, że obniżenie cytotoksyczności tej toksyny dotyczy zarówno zahamowania syntezy białek, jak też indukcji procesu apoptozy (dane nie publikowane). Co istotne, nasze badania pokazują, że rycyna P250A, posiadająca pełne właściwości katalityczne, wpływa na obniżenie przeżywalności komórek nowotworowych podobnie jak rycyna dzikiego typu. Obniżenie cytotoksyczności rycyny P250A, które może wpłynąć na zmniejszenie VLS, nie wiązałoby się zatem z koniecznością zwiększania terapeutycznej dawki immunotoksyn zawierających tę formę rycyny. Zakładam, że istnieje możliwość wykorzystania rycyny P250A do konstrukcji efektywnie działających immunotoksyn, wykazujących aktywność we wszystkich bądź też niektórych typach komórek nowotworowych. Moje najbliższe plany badawcze obejmują m.in.:

- zbadanie efektu cytotoksycznego rycyny P250A w komórkach śródbłonkowych;
- określenie zależności pomiędzy obniżoną cytotoksycznością rycyny P250A a zespołem przesiąkania naczyniowego;
- analizę zahamowania syntezy białek i indukcji procesu apoptozy zależnych od rycyny dzikiego typu i P250A w różnych typach komórek nowotworowych.

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

- transport podjednostki A rycyny z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu zależny jest od białek opiekuńczych EDEM1 i EDEM2;
- obniżenie cytotoksyczności zmodyfikowanej rycyny P250A związane jest z podwyższonym poziomem endosomalno-lizosomalnej degradacji tej toksyny oraz z obniżeniem jej transportu do cytozolu;
- transport zmodyfikowanej formy RTA<sub>P250A</sub> do cytozolu nie jest zależny od białek EDEM1 i EDEM2;
- podjednostka A rycyny oddziałuje zarówno z EDEM1 i EDEM2, większa jej ilość może jednak wchodzić w interakcje z białkiem EDEM2;
- preferencje rozpoznawania substratów białkowych przez EDEM1 i EDEM2 mogą być zróżnicowane;
- struktura substratu białkowego, jak też jego odpowiednia hydrofobowość są niezwykle istotne w rozpoznawaniu białek przez glikoproteiny EDEM1 i EDEM2;
- EDEM1 i EDEM2 mogą rozpoznawać wyeksponowane rejony hydrofobowe białek, ale też rejony transbłonowe.

**5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).**

W 1994 roku rozpoczęłam studia magisterskie na kierunku Biotechnologia prowadzonym przez Międzyuczelniany Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego). Już w trakcie studiów, na trzecim roku, dołączyłam do grupy badawczej Pana Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Tematem prowadzonych przeze mnie badań naukowych była regulacja rozwoju bakteriofaga  $\lambda$  przez specyficzny nukleotyd - czterofosforan guanozyny (ppGpp). Po zakażeniu komórki *Escherichia coli* (*E. coli*) bakteriofag  $\lambda$  może wejść w jedną z dwóch alternatywnych dróg rozwojowych. Rozwój lityczny prowadzi do wytworzenia wirionów potomnych oraz ich uwolnienia po lizie komórki gospodarza; alternatywny cykl lizogeniczny polega na wbudowaniu genomu faga do chromosomu gospodarza i przejściu w stadium profaga. Wyniki naszych eksperymentów wykazały, że wydajność lizogenizacji szczepu *E. coli* pozbawionego całkowicie ppGpp

jest znacznie obniżona w porównaniu z bakteriami dzikiego typu. Stwierdziliśmy, że upośledzony jest proces tworzenia profaga, a nie jego stabilnego utrzymywania. Ponadto wyniki naszych badań pokazały, że poziom proteazy HflB/FtsH, która odpowiedzialna jest za degradację białka CII, aktywatora promotorów cyklu lizogenizacji, zależna jest od stężenia ppGpp. W dalszej części pracy badaliśmy także aktywność promotorów faga  $\lambda$  zaangażowanych w decyzję liza-lizogenizacja podczas nadprodukcji i braku ppGpp. Nadmiar i brak ppGpp oddziaływały w bardzo zróżnicowany sposób na promotory faga  $\lambda$ , wyniki naszych badań pokazały także, że stężenie cAMP może mieć wpływ na ilość powstającego ppGpp. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów dowiodły, że czterofosforan guanozyny kontroluje rozwój bakteriofaga  $\lambda$  poprzez regulację aktywności poszczególnych promotorów. Obrona pracy magisterskiej pt. „Kontrola rozwoju bakteriofaga  $\lambda$  przez czterofosforan guanozyny” odbyła się w czerwcu 1998 roku, a jej wyniki zostały opublikowane w międzynarodowym prestiżowym czasopiśmie naukowym *Virology* (Słomińska i wsp., 1999, punkt IIA-1, załącznik 3).

Po ukończeniu studiów, w latach 1998-2003, byłam słuchaczką Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii, Uniwersytetu Gdańskiego. Moje zainteresowania naukowe dotyczyły charakterystyki bakteryjnego białka SeqA. Wcześniejsze badania prowadzone w różnych ośrodkach międzynarodowych wykazały, że białko to jest negatywnym regulatorem inicjacji replikacji DNA chromosomalnego bakterii *E. coli*, a także pełni zasadniczą rolę w procesie zwanym sekwestracją, który polega na czasowej ochronie nowo zreplikowanego *origin* przed kolejną rundą inicjacji replikacji. Podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej interesowała mnie rola białka SeqA w regulacji ekspresji określonych genów bakteriofaga  $\lambda$ . Rezultatem tych badań były publikacje opisane w punkcie IIA-3, 7, 8, 9 (załącznik 3). Wyniki tych prac pokazują po raz pierwszy, że białko SeqA może pełnić rolę specyficznego czynnika transkrypcyjnego (Słomińska i wsp., 2001, punkt IIA-3, załącznik 3). Badania prowadzone z wykorzystaniem fragmentów DNA zawierających promotory faga  $\lambda$  udowodniły, że SeqA jest specyficznym aktywatorem transkrypcji zachodzącej z promotorów  $p_R$ ,  $p_I$  i  $p_{aQ}$ , w przeciwieństwie do nich nie wpływa natomiast na aktywację transkrypcyjną promotorów  $p_L$  i  $p_E$  (Słomińska i wsp., 2001, punkt IIA-3; Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-7, załącznik 3). W specyficznej aktywacji transkrypcyjnej określonych promotorów przez białko SeqA niezwykle istotnym czynnikiem jest wiązanie się tego białka do DNA w bliskim sąsiedztwie danego promotora. W wiązaniu tym kluczową rolę odgrywają sekwencje GATC, które związane są ze statusem metylacji DNA. SeqA wiąże się do matrycy całkowicie zmetylowanej i hemimetylowanej, nie rozpoznaje natomiast fragmentu niemetylowanego (Słomińska i wsp., 2001, punkt IIA-3, załącznik 3). W naszych badaniach udowodniliśmy także, że ilość i rozmieszczenie miejsc GATC ma kluczowe znaczenie w wiązaniu się białka SeqA do DNA (Słomińska i wsp., 2001, punkt IIA-3; Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-7, załącznik 3). Ponadto liczba kopii, a tym samym regulacja replikacji plazmidów zawierających *ori $\lambda$*  zależna jest od ilości białka SeqA w komórce, a dokładniej od możliwości wiązania się tego białka do DNA (Słomińska i wsp., 2001, punkt IIA-3, załącznik 3).

Podczas specyficznej aktywacji określonych promotorów białko SeqA może współdziałać z innymi aktywatorami transkrypcji. Badaliśmy oddziaływania SeqA i białka CII, aktywującego transkrypcję zachodzącą z promotorów kluczowych w procesie lizogenizacji faga  $\lambda$  (**Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-7, załącznik 3**), a także oddziaływania SeqA i białka DnaA, to ostatnie jest specyficznym aktywatorem promotora  $p_R$  związanego z cyklem lizy bakteriofaga  $\lambda$  (**Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-8, załącznik 3**). W pierwszym przypadku SeqA jest bardzo istotnym czynnikiem powodującym wzmocnienie właściwości aktywacyjnych białka CII podczas stymulacji promotorów  $p_I$  oraz  $p_{aQ}$ . Wyniki eksperymentów transkrypcji *in vitro* pokazały najwyższą aktywację transkrypcyjną tych promotorów w sytuacji, kiedy białko SeqA było preinkubowane z matrycą w pełni zmetylowaną przed dodaniem białka CII do mieszaniny reakcyjnej (**Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-7, załącznik 3**). Badania te sugerują, że białko SeqA ułatwia prawdopodobnie wiązanie się CII w okolicach aktywowanych przez niego promotorów. W przypadku promotora  $p_R$ , białko SeqA jest jego specyficznym aktywatorem, działającym niezależnie od białka DnaA (**Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-8, załącznik 3**). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że ważna jest kolejność wiązania się obu białek do matrycy zawierającej promotor  $p_R$ . Związanie się białka SeqA bądź DnaA w optymalnym dla aktywacji transkrypcyjnej stężeniu przypuszczalnie zapobiega wiązaniu się drugiego z aktywatorów. Można zatem wnioskować, że białka DnaA i SeqA, mimo że rozpoznają dwa różne typy sekwencji, konkurują ze sobą o miejsce wiązania się na DNA.

Dalsza część badań wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej została wykonana w ścisłej współpracy z Panią Prof. Kirsten Skarstad (Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, Oslo, Norwegia). W ramach tej współpracy, w 2000 roku przebywałam na trzymiesięcznym stażu naukowym (stypendium *EMBO short-term fellowship*) w laboratorium Pani Prof. Skarstad oraz na półrocznym stażu (stypendium ESF) w 2002 roku (staż łączony z pobytem w laboratorium Pana Prof. Løbner-Olesen, Dania). Zajął się wówczas badaniem oddziaływań między białkiem SeqA a zmodyfikowaną formą DnaA - białkiem DnaA204 (**Słomińska i wsp., 2003, punkt IIA-9, załącznik 3**). Pierwszym etapem tych badań była obserwacja zjawiska obniżonej degradacji białka DnaA204 w mutantach *seqA*. Przeprowadzone przez nas badania wykazały istnienie korelacji między przyspieszoną degradacją DnaA204 a wiązaniem się białka SeqA do DNA. Zmiana stabilności DnaA204 może być wynikiem oddziaływań tego białka z kompleksami SeqA-DNA lub też może wynikać ze zmian w topologii DNA wywołanych związaniem się białka SeqA. Kolejne eksperymenty wykazały także, że białko DnaA204 jest stabilizowane w obecności białek opiekuńczych ClpX i ClpA, a degradowane przez proteazę ClpP. Białko DnaA204 jest również degradowane przez proteazy ClpQ i Lon, z kolei białko opiekuńcze ClpY jest niezbędne dla jego stabilności i prawidłowego funkcjonowania. Białko DnaA204 może być również stabilizowane przez białka opiekuńcze: GroES, GroEL i DnaK.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że biologiczną rolą aktywacji transkrypcyjnej określonych promotorów faga  $\lambda$  przez białko SeqA jest regulacja replikacji plazmidów  $\lambda$ , a prawdopodobnie także całego genomu bakteriofaga  $\lambda$ . Białko SeqA uczestniczy w wyborze jednej z dwóch alternatywnych

dróg rozwojowych faga  $\lambda$ , lizy albo lizogenizacji komórki gospodarza. Funkcje, jakie białko SeqA pełni w specyficznej aktywacji transkrypcyjnej promotorów  $p_R$ ,  $p_I$  i  $p_{aQ}$ , leżą u podstaw zrozumienia tego procesu. Brak oddziaływań SeqA z DNA wpływa na stabilność białka Dna204. Informacje te są istotne w lepszym zrozumieniu regulacji inicjacji replikacji chromosomu *E. coli*.

Obrona pracy doktorskiej zatytułowanej „Rola białka SeqA w regulacji replikacji, transkrypcji i rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ ” odbyła się 7 maja 2003 roku. Promotorem pracy był Pan Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, a recenzentami: Pani Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu oraz Pani Prof. dr hab. Barbara Lipińska z Katedry Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2004 roku praca uzyskała nagrodę Prezesa Rady Ministrów RP za wyróżnioną rozprawę doktorską.

W toku prac prowadzonych podczas studiów doktoranckich zajmowałam się również inną tematyką badawczą. Współpracując z zespołem Pana Prof. dr hab. Jerzego Rokickiego z Katedry Bezkręgowców Uniwersytetu Gdańskiego, uczestniczyłam w pracach, których celem było skonstruowanie testu opartego na technice PCR-RFLP służącego do identyfikacji nicieni *Anisakis simplex* pochodzących z różnych rejonów geograficznych (**Kijewska i wsp., 2000, praca IIA-2, załącznik 3**).

Współpraca z Panią dr Agatą Czyż z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego dotyczyła charakterystyki genów *cgTA* *Vibrio harveyi* oraz *yhbZ* *E. coli* kodujących małe białka wiążące GTP, które należą do rodziny białek Obg/Gtp1. Wyniki eksperymentów z użyciem bakterii niosących mutację insercyjną w genie *cgTA* pokazały, że produkt tego genu pełni bardzo istotną rolę w regulacji synchronizacji replikacji chromosomu *Vibrio harveyi* (**Słomińska i wsp., 2002, praca IIA-4, załącznik 3**). Zahamowanie replikacji chromosomu w tym szczepie bakteryjnym skutkowało powstawaniem bardzo dużej ilości komórek wykazujących zaburzenia podziału. Dalsze eksperymenty badania kinetyki replikacji DNA przeprowadzone z użyciem specyficznych inhibitorów blokujących proces replikacji i podziałów komórkowych udowodniły, że produkt genu *cgTA* odgrywa istotne znaczenie regulacyjne, sprzęgając proces wzrostu komórek z replikacją chromosomu i podziałami komórkowymi (**Sikora-Borgula i wsp., 2002, praca IIA-5, załącznik 3**). Nadekspresja genu *cgTA* (*yhbZ*, *obgE*) w bakteriach *E. coli* skutkowała powstawaniem komórek o wydłużonym kształcie z wyraźnie zmienioną dystrybucją chromosomalnego DNA (**Dutkiewicz i wsp., 2002, praca IIA-6, załącznik 3**). Wyniki te sugerują, że białka z rodziny Obg/Gtp1 pełnią istotną funkcję regulacyjną w synchronizacji inicjacji replikacji lub rozdziału chromosomów potomnych w komórkach bakteryjnych.

Po skończeniu studiów doktoranckich, w październiku 2003 roku zostałam zatrudniona na etacie naukowo-dydaktycznym, na stanowisku adiunkta w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. W listopadzie 2003 wyjechałam na staż naukowy do laboratorium Pani Prof. Kirsten Sandvig, Institute for Cancer Research, Oslo, Norwegia. Laboratorium to jest jednym z najlepszych ośrodków naukowych na świecie zajmujących się badaniem toksyn oraz ich transportu

wewnątrzkomórkowego. Staż podoktorski finansowany był przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej w ramach *EMBO long-term fellowship*. Rozmowa kwalifikacyjna niezbędna do otrzymania stypendium została przeprowadzona przez Pana Prof. dr Felixa Wielanda, Biochemistry Center, University of Heidelberg, Niemcy.

Oprócz prac wymienionych w pierwszej części autoreferatu, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego byłam również zaangażowana w inne prace eksperymentalne. W badaniach kierowanych przez Pana Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, skupiłam się na analizie wpływu ilości miejsc GATC na zależną od białka SeqA regulację aktywności różnych promotorów (**Strzelczyk i wsp., 2003, praca IIA-10, załącznik 3**). Analiza fragmentów DNA w pozycji od -250 do +250 w stosunku do miejsca startu transkrypcji promotorów aktywowanych lub hamowanych przez białko SeqA pokazała, że miejsca GATC są istotnym, aczkolwiek nie jedynym czynnikiem regulacyjnym tych promotorów.

Wynikiem mojej współpracy z grupą badawczą Pana Prof. Andersa Løbner-Olesena (Department of Microbiology, Technical University of Denmark, Lyngby, Dania) były badania nad rolą białka DnaC w regulacji indukcji procesu SOS oraz ekspresji genów biosyntezy nukleotydów (**Løbner-Olesen i wsp., 2008, punkt IIA-11, załącznik 3**). Podczas tych prac miałam okazję zapoznać się z techniką pracy z mikromacierzami DNA. Wyniki naszych eksperymentów pokazały, że w szczepie *E. coli* niosącym mutację *dnaC2* odpowiedź SOS jest indukowana przez formowanie kompleksu otwartego *oriC* lub przez czasowe zahamowanie działania widełek replikacyjnych.

Moje zainteresowania naukowe skupiły się również na regulacji transkrypcji genu *pcnB* *E. coli* kodującego poli(A) polimerazę I (**Nadratowska-Wesołowska B i wsp., 2010, praca IIA-12, załącznik 3**). Regulacja ta jest bardzo złożonym procesem, zależnym od ppGpp, białka DksA oraz podjednostek  $\sigma^{70}$  i  $\sigma^S$  polimerazy RNA.

W okresie ostatnich kilku lat miałam również przyjemność współpracować z grupą badawczą Pana Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna zajmującą się badaniem lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD). Wynikiem tej współpracy są trzy prace, które opisują: biochemiczne podłoża różnic w zachowaniu dzieci cierpiących na różne typy mukopolisacharydoz (MPS) (**Węgrzyn i wsp., 2010, praca IIA-13; załącznik 3**), długoterminowe efekty podawania pacjentom cierpiącym na chorobę Sanfilippo izoflawonu genisteiny (**Piotrowska i wsp., 2011, punkt IIA-14, załącznik 3**) oraz różne typy terapii mukopolisacharydoz (**Jakóbkiewicz-Banecka i wsp., 2011, praca IIA-15, załącznik 3**).

Wyniki moich prac były prezentowane na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych, co opisane jest w punktach **III K i III B** (załącznik 3).

Podsumowując, moje osiągnięcia naukowo-badawcze, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obejmują 15 prac, które ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Sumaryczny IF = 48,23. Liczba cytowań tych prac to 164, w tym 155 bez autocytowań (dane wg. bazy Web of Science).

12.02.2015 Monika Słomińska-Wojewódzka