

Wpływ poziomu ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI na efektywność restrykcji inwazyjnego DNA
Karolina Wilkowska

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne są najbardziej rozpowszechnionymi, wśród bakterii, mechanizmami obronnymi przed inwazyjnym DNA. Równowaga pomiędzy restrykcją a modyfikacją stanowi o stabilności utrzymywania się systemu w komórce, a także wydajności restrykcji wirusowego DNA. Jak dotąd nie były badane optymalne poziomy produkcji białek, endonukleazy restrykcyjnej i metylotransferazy, które zapewniałyby maksymalną protekcję. W tej pracy została zbadana ta zależność na przykładzie modelowego systemu R-M EcoRI, pochodzącego z *Escherichia coli*.

Badania prowadzone na dwóch plazmidach, z których każdy cechował się innym poziomem ekspresji genów R-M, pozwoliły na wykazanie, że niski poziom ekspresji genów systemu EcoRI (plazmid pACYCeco) przyczynia się do wysokiej wydajności restrykcji inwazyjnego DNA bakteriofaga λ , w przeciwieństwie do wysokiego poziomu ekspresji (plazmid pIM-RM), gdzie restrykcja była niższa o 3 rzędy różnicy, prawdopodobnie wskutek modyfikacji ochronnej DNA wirusowego. Analiza poziomu ekspresji genów systemu EcoRI w plazmidzie pIM-RM wykazała 10- i 14-krotnie wyższy poziom transkrypcji genów *ecoRIM* i *ecoRIR* w porównaniu do plazmidu pACYCeco, co przekładało się na 6-krotnie większą ilość produkowanych białek. W pracy zbadano rolę poszczególnych elementów genetycznych w operonie systemu R-M EcoRI, dzięki którym możliwa jest regulacja ekspresji wpływająca na funkcjonalność biologiczną systemu R-M, tj. sekwencja promotora, rejon miejsca wiązania rybosomu, poza-operonowe sygnały transkrypcyjne, jak obecność dodatkowego silnego promotora poprzedzającego system R-M. Stosując modyfikacje rejonu promotorowego operonu oraz zmieniając liczbę kopii determinaty R-M EcoRI wykazano, że możliwa jest odwracalna zmiana funkcjonalnej efektywności systemu. Obniżenie liczby kopii plazmidu, badane w szczepie *E. coli* MM294 z mutacją *pcnB80* podwyższało 1000-krotnie wydajność restrykcji inwazyjnego DNA plazmidu pIM-RM w porównaniu do szczepu dzikiego. Ponadto, zaobserwowano toksyczny wpływ stałego, wysokiego poziomu produkcji białek R-M na żywotność komórek bakteryjnych, przyczyniającego się do powstawania filamentów na skutek autorestrykcji chromosomu i indukcji komórkowej odpowiedzi SOS. Efekt ten był niwelowany poprzez zapewnienie dodatkowego źródła metylacji ochronnej.