

Dr hab. Aneta Agnieszka Bartosik
Pracownia Segregacji DNA i Cyklu Życiowego Proteobakterii
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
e-mail: aneta2@ibb.waw.pl
tel.: (+48 22) 592 1215

Warszawa 19.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Aleksandry Wiśniewskiej pt.

**„Molekularny mechanizm krzyżowego działania dwóch czynników transkrypcyjnych:
białka C systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I
oraz represora RacR defektywnego profaga *Escherichia coli*”**

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Badania w niej opisane zostały wykonane w Katerze Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, pod opieką naukową prof. UG. dr hab. Iwony Mruk. Podjęta w pracy tematyka stanowi ciekawy i dobrze rozwijający się nurt badań naukowych kierowanych przez promotora pracy prof. Iwonę Mruk, na które uzyskała finansowane z grantów Narodowego Centrum Nauki OPUS10 nr 2015/19/B/NZ2/01835 oraz OPUS18 nr 2019/35/B/NZ2/00701. Doktorantka uczestniczyła tym samym w realizacji zadań badawczych dwóch projektów naukowych jako wykonawca, a w trakcie prowadzonych badań mogła korzystać z doświadczenia, wiedzy i bogatego zaplecza badawczego stworzonego przez opiekuna pracy, współpracowników i uczelnię.

Głównym celem pracy było wyjaśnienie mechanizmu odpowiedzialnego za proces formowania się wydłużonych komórek bakteryjnych w szczepie *Escherichia coli* MG1655 niosących geny systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Typu II Csp231I (R-M Typu II Csp231I), pochodzącego ze spokrewnionej bakterii *Citrobacter* sp. RFL231.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Wiśniewskiej ma formę monografii liczącej 111 stron, napisanej w języku polskim, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, pomocnym wykazem skrótów wykorzystywanych w pracy, z podziałem na rozdziały charakterystyczne dla opracowań naukowych opartych o badania eksperymentalne: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki,

Dyskusja, Podsumowanie oraz Literatura. W pracy umieszczono 3 tabele oraz 49 rycin. Tytuł rozprawy doktorskiej opisuje poruszaną tematykę i odzwierciedla cele i zakres opisywanych badań. Praca jest napisana zrozumiale, zwięźle, bez zbędnych dygresji i dobrze się ją czyta.

Wstęp stanowi doskonale wprowadzenie do tematyki podjętej w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej. Na 16 stronach, w syntetyczny i przejrzysty sposób Doktorantka opisała zagadnienia związane z regulacją transkrypcji u bakterii, roli miejscowych i globalnych czynników transkrypcyjnych, a także sieci regulacyjnych w tym procesie. W niezależnych podrozdziałach opisano także czynniki wpływające na zakłócanie bakteryjnych sieci regulacji transkrypcji, a także zjawisko reakcji krzyżowej (ang. *cross-talk*). We wstępie rozprawy znalazła się także krótka charakterystyka systemów restrykcji-modyfikacji typu II wraz z organizacją genetyczną systemu R-M Csp231I z *Citrobacter* sp. RFL231, który stanowił jeden z obiektów badań w pracy wraz z represorem RacR kryptycznego profaga Rac *Escherichia coli*.

Cel pracy został jasno sformułowany i uzupełniony o wyszczególnienie zadań, które zaplanowano by osiągnąć cel, którym było poznanie mechanizmu odpowiedzialnego za proces formowania wydłużonych komórek w szczepie *E. coli* MG1655 niosących geny systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Typu II Csp231I, pochodzącego ze spokrewnionej bakterii *Citrobacter* sp. RFL231.

W rozdziale Materiały Doktorantka zawarła szczegółowe informacje na temat szczepów, konstruktów, starterów, podłoży wykorzystywanych w pracy, a także odczynników, zestawów, buforów niezbędnych do wykonania eksperymentów. Wykorzystywane do realizacji zadań badawczych metody genetyczne, molekularne i mikrobiologiczne zostały opisane w 24 podrozdziałach w rozdziale Metody rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że zastosowane techniki i metody badawcze świadczą o doskonałym warsztacie metodycznym Doktorantki.

Wyniki rozprawy doktorskiej opisane zostały w 16 podrozdziałach i zobrazowane na 37 rycinach w rozdziale Wyniki. Trudne niejednokrotnie prace eksperymentalne zostały zaplanowane i wykonane starannie, a uzyskane wyniki opisane klarownym, zrozumiałym językiem, z umiejętnie dobranymi schematami, wykresami i figurami znacząco ułatwiającymi ich percepcję.

Uzyskane w badaniach wyniki zostały przedyskutowane w oparciu o aktualny stan wiedzy, z odniesieniami do najnowszych osiągnięć i badań w poruszonym temacie w rozdziale Dyskusja, z odpowiednio dobraną i cytowaną literaturą. Dyskusja skupia się na dwóch zagadnieniach: odkrytej reakcji krzyżowej (ang. *cross-talk*) pomiędzy dwoma niespokrewnionymi czynnikami transkrypcyjnymi i ich konsekwencji dla komórek gospodarza oraz analogii regionu *racR – ydaST* profaga do regionu „decyzji” bakteriofaga λ . Dyskutowane są m.in. zdolność czynników transkrypcyjnych do rozpoznawania i wiązania do rodzimych sekwencji docelowych, jak i do

miejsc drugorzędowych, niespokrewnionych i ich konsekwencji dla funkcjonowania istniejących sieci regulacyjnych w komórkach.

Warto podkreślić, że znacząca część osiągnięć Doktorantki opisana w rozprawie doktorskiej została już opublikowana w dwóch znakomitych publikacjach, które ukazały się w 2019 i 2022 roku w renomowanym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Tym bardziej na pochwałę zasługuje fakt, że Doktorantka postanowiła napisać klasyczną rozprawę doktorską w postaci monografii w oparciu o uzyskane wyniki, uzupełnione adekwatnym do podjętej tematyki wstępem oraz niezależną dyskusją. W pierwszej pracy z 2019 Doktorantka jest trzecim współautorem z pięciu, natomiast w pracy z 2022 jest pierwszym autorem z siedmiu współautorów. Prace te były już kilkakrotnie cytowane pokazując znaczenie opublikowanych wyników dla szerokiego grona badaczy na świecie.

W trakcie badań nad charakterystyką systemu R-M Csp231I z *Citrobacter* sp. RFL231 w laboratorium kierowanym przez Panią prof. Iwonę Mruk zaobserwowano, formowanie się filamentów, czyli wydłużonych komórek szczepu *E. coli* MG1655 niosących geny systemu R-M Typu II Csp231I na plazmidzie. Ustalono, że zjawisko to nie jest związane z uruchomieniem komórkowej odpowiedzi SOS, a ma bezpośredni związek z aktywnością białka C, czyli regulatora systemu R-M Typu II Csp231I. Obecność białka C przyczyniała się do zmniejszenia żywotności komórek *E. coli* MG1655 i było to niezależne od ekspresji genów systemu R-M Typu II Csp231I. Przeprowadzone analizy transkryptomyczne z wykorzystaniem techniki RNA-seq, komórek niosących plazmidy z systemem R-M typu dzikiego i jego pochodnych wykazały, że tylko w komórkach z aktywnym genem C poziom ekspresji kilkunastu genów w obrębie krytycznego faga Rac w komórkach *E. coli* MG1655 był znacząco podwyższony. Uwagę badaczy zwrócił jedyny gen tego regionu, *racR*, który charakteryzował się obniżoną ekspresją. Należy on do grupy genów określanych jako niezbędne do przeżycia dla komórek szczepu *E. coli* MG1655, a największa delecja niepowodująca śmierci komórki jest możliwa z zachowaniem genu *racR* i *ydaS* wraz z regionem intergenicznym występującym pomiędzy tymi rozbieżnie transkrybowanymi genami. Gen *racR* koduje czynnik transkrypcyjny zaangażowany w represję operonu *ydaST*. W recenzowanej pracy pokazano, że obecność białka C prowadzi do zakłóceń w funkcjonowaniu regulonu RacR, prowadząc do spadku ekspresji genu *racR*, co skutkuje de-represją genów *ydaS* i *ydaT*. Ustalono, że aktywność YdaS, a w szczególności YdaT prowadziła do formowania się wydłużonych komórek, co związane jest prawdopodobnie z zaburzeniem podziałów komórkowych, w procesie niezależnym od komórkowej odpowiedzi SOS.

Opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej badania, umiejętnie zaplanowane i zrealizowane, wykorzystujące zróżnicowane metody *in vivo* i *in vitro*, konsekwentnie i w klarowny sposób, odsłoniły molekularny mechanizm krzyżowego działania dwóch niespokrewnionych

czynników transkrypcyjnych: białka C systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I oraz represora RacR defektywnego profaga *E. coli*. Wcześniejsze badania pokazały, że białko C wiąże się do sekwencji tzw. C-box w obrębie swojego promotora. Badania Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej pokazały, że dodatkowo białko to jest także zdolne do wiązania się do sekwencji promotorowej genu *racR* w rejonie profaga Rac w genomie *E. coli* MG1655. Zmapowano dokładne miejsce wiązania białka C z DNA w rejonie *rac*, ustalając rozpoznawaną sekwencję DNA. Dalsze badania pokazały, że miejsce to pokrywa się z miejscem wiązania białka RacR, pełniącego rolę autorepresora i represora sąsiednich genów *ydaST*, których ekspresja jest niekorzystna dla komórki. W badanym modelu, zaburzenie w ekspresji *racR* spowodowane wiązaniem białka C do promotora genu *racR* prowadziło do de-represji genów *ydaST* i w konsekwencji do filamentacji komórek.

Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej pokazują ważną rolę czynników transkrypcyjnych, pozyskiwanych na drodze horyzontalnego transferu genów w modulacji ekspresji genów gospodarza. Odkryte zależności pomiędzy białkiem C, a regulonem RacR mogą stanowić nieodosobniony przykład istniejących zależności, powiązań, powstających w toku ewolucji, pomiędzy białkami regulatorowymi, a ich naturalnymi, jak i niespokrewnionymi celami w sieciach regulacyjnych, które mogą mieć niebagatelny wpływ na funkcjonowanie komórki. Fakt, że badane w pracy regulatory powiązane są z regulacją systemu R-M oraz genów profagowych i mają związek z horyzontalnym transferem genów, podkreśla dodatkowo wagę uzyskanych wyników i ich znaczenia dla zrozumienia funkcjonowania i ewolucji sieci regulacyjnych zawiadujących ekspresją genów, procesów kontrolujących horyzontalny transfer genów oraz ich wpływu na ewolucję bakterii.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych nieścisłości, niedociągnięć językowych, literowych, stylistycznych, nomenklaturowych, edytorskich, itp.:

- tytuł pracy w języku angielskim nieco odbiega od brzmienia w języku polskim: głównie chodzi o słowo „*unrelated*”, którego zabrakło w wersji polskiej;
- zbędna kropka w tytule pracy tak w wersji w języku polskim, jak i angielskim;
- w sekcji Źródła finansowania – nie „finansowany przez Narodowe Centrum Nauki” a „finansowany przez Narodowe Centrum Nauki”;
- str. 25, rozdz.1.8. – zamiast „białko nukleoidowe” raczej powinno być „białko związane z nukleoidem”, jako termin stosowany dla określenia białek typu NAP;
- brak spisu tabel i rycin, który bywa pomocny;
- str. 33 - pBR ori, powinno być *ori pMB1*, ewentualnie pochodna pBR322 z *ori pMB1*;
- braku informacji o plazmidzie, który wykorzystywany był do nadprodukcji i oczyszczania białka C z systemu R-M Csp231I wykorzystywanego w testach typu *EMSA* czy też *footprint* czy też brak

dokładniejszego opisu sposobu klonowania i modyfikacji genu *racR* w wektorze pBAD-33 (Tabela 2), jako konstruktów powstałych w tej pracy;

- brak informacji jakie białka fuzyjne ze znacznikiem His-6 na N- czy C-końcu białka były wykorzystywane w badaniach *in vitro*;

- brak opisu metody oczyszczania białka C choć badana była jego zdolność do interakcji z DNA w testach typu EMSA;

- rozbieżności w opisie pH pożywek przedstawionych w rozdz. 3.6, s. 36 - Materiały;

- czy rzeczywiście w stosowanych ligacjach stosowano 2 ul insertu (wstawki) w stosunku do 5 µl wektora, s. 43 – Metody;

- rozdz. 4.11 – czy rzeczywiście po wirowaniu i zlaniu supernatantu osad bakteryjny zawieszano w buforze NPi-10 i przechowywano w – 80 °C do dalszych analiz, czy też zamrażany był osad, który następnie rozmrażano i zawieszano w buforze, jak napisano poniżej w podrozdz. 4.12.1?

- niefortunne stwierdzenie „zawieszałam z mastermixie” (4.16, s. 47);

- Ryc. 9 - brak opisu jak mierzono relatywną restrykcję;

- niepełny opis metody przedstawionej w rozdz. 4.20, w opisie wyników (rozdz. 5.2) odwołania do pomiarów OD, podczas gdy na Ryc. 12 przedstawiono krzywe wzrostu dla danych z wartością CFU, co może być oczywiście bardziej miarodajne w przypadku filamentujących komórek;

- Ponieważ w rozdziale 5.3 przedstawiono wyniki dotyczące porównawczej analizy transkryptomicznej komórek niosących różne warianty badanego systemu R-M, w sekcji Metody powinien znaleźć się adekwatny rozdział opisujący szczepy, warunki hodowli, izolacji RNA, sekwencjonowania i przeprowadzonych analiz danych transkryptomicznych. Nie jest też jasne w jakim zakresie Doktorantka uczestniczyła w tych badaniach.

- błędne odwołanie do metody opisującej barwienie fluorescencyjne typu LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher) w rozdz. 5.6 (str. 63) – „Metody 4.12.”, a powinno być 4.16.

- Przydane jest zobrazowanie odkrytej reakcji krzyżowej pomiędzy niespokrewnionymi czynnikami transkrypcyjnymi: białkiem C i represorem RacR przedstawione na Ryc. 45, jednak zbyteczne wydaje się pokazywanie tych samych zdjęć prezentowanych wcześniej na Ryc. 8.

- Znacząca część figur w rozprawie doktorskiej, zawiera wyniki prezentowane już w opublikowanych, wspomnianych oryginalnych artykułach (Wiśniewska et al., 2022; Negri et al., 2019), dzięki czemu bez problemu można wywnioskować, jaki był wkład Doktorantki w poszczególnych manuskryptach. Zabrakło w niektórych opisach figur rozprawy doktorskiej (z wyjątkiem Ryc. 13) odnośników do opublikowanych prac. Pojawiają się one co prawda w dyskusji, ale warto byłoby je również przytoczyć przy adekwatnych figurach, czy też w opisach wyników.

Należy jednak podkreślić, że wypunktowane niedociągnięcia, braki nie umniejszają bardzo wysokiej, pozytywnej ocenie rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników przez Panią mgr Aleksandrę Wiśniewską.

Mam kilka pytań, kwestii, które nasunęły się po lekturze tej rozprawy, które zamieszczam poniżej, prosząc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony:

1. Czy przyjęte jest w języku polskim zamiennie stosowanie określeń system restrykcyjno-modyfikacyjny i system restrykcji-modyfikacji, czy jednak występują różnice w stosowaniu?
2. Czym można tłumaczyć występowanie białka RacR w dwóch formach: dłuższej (8 helis) i krótszej (5 helis) jak zobrazowano na Ryc.14? Czy może to mieć znaczenie dla właściwości regulatorowych tego białka w różnych gospodarzach?
3. Jakie eksperymenty można zaplanować, które umożliwiłyby charakterystykę funkcjonalną białek YdaST i określenie ich biologicznej funkcji? Jest to szczególnie interesujące w powiązaniu z obserwowanym fenotypem filamentacji komórek z aktywnymi białkami YdaST.
4. Jakie wyjaśnienie można zaproponować jeśli chodzi o przyczynę zaobserwowanego zjawiska, w którym komórka spontanicznie zmienia fenotyp, zatrzymując proces filamentacji w warunkach produkcji regulatora C w komórkach *E. coli* MG1655 o zmniejszonej żywotności?
5. Jak powszechne jest współwystępowanie genu regulatorowego białka C i systemów R-M? Czy jest to cecha obserwowana tylko w rodzinie *Enterobacteriaceae* czy także u innych przedstawicieli bakterii?
6. Czy regulacja z udziałem białka C jest jedynym znanym sposobem kontroli systemów R-M w bakteriach?

Podsumowując, warto podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca stanowi znaczący wkład w zrozumienie funkcjonowania działania sieci regulacyjnych w bakteriach z uwzględnieniem nieoczywistych reakcji krzyżowych, które mają miejsce w sieciach regulacyjnych, pełniąc ważną rolę w ewolucji. Uzyskane wyniki wydają się szczególnie ciekawe z punktu widzenia pozyskiwania obcego DNA na drodze horyzontalnego transferu genów i włączania nowej puli genów do istniejących sieci regulacyjnych i odwrotnie wpływu, jaki nowo nabyte geny mogą wywierać na komórki gospodarza i regulację ekspresji genów. Z tego względu podjęte w rozprawie doktorskiej Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej zagadnienie badawcze i uzyskane oryginalne wyniki są niezwykle aktualne, charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi, naukowymi, o możliwym znaczeniu aplikacyjnym.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm. o

stopniach i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem i poparciem zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy prezentowanej rozprawy oraz poznawcze i praktyczne znaczenie przedstawionych wyników oraz fakt ich opublikowania w postaci dwóch oryginalnych artykułów naukowych, wnioskuję o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.



Dr hab. Aneta Bartosik