



**WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII**

**Zakład Biochemii Analitycznej**

**Dr hab. Benedykt Władyka, prof. UJ**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Wiśniewskiej pt.  
„Molekularny mechanizm krzyżowego działania dwóch czynników  
transkrypcyjnych: białka C systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego  
Csp231I oraz represora RacR defektywnego profaga *Escherichia  
coli*”**

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Iwony Mruk, prof. UG. W ramach rozprawy przedstawiono molekularny mechanizm derepresji wybranych genów profaga Rac przez czynnik transkrypcyjny z kasyty systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I prowadzący do powstania fenotypu bakterii *Escherichia coli* o drastycznie wydłużonych komórkach. Już na początku warto zaznaczyć, że duża część wyników została już opublikowana w dwóch pracach oryginalnych w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, a Doktorantka jest pierwszym autorem w jednej z nich.

Horizontalny transfer genów (HTG), jest jednym ze źródeł zmienności genetycznej bakterii. Przeważnie rozpatrywany jest w kontekście nabywania nowych cech przez te mikroorganizmy, zwłaszcza oporności na antybiotyki. Pozyskiwanie nowego materiału genetycznego podlega jednak kontroli, czego przykładem są systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M), które zapobiegają między innymi niekontrolowanej propagacji bakteriofagów. W pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej mamy do czynienia zarówno z HTG, systemem R-M oraz profagiem, jednak wzajemne interakcje prowadzą do zaskakującego fenotypu. Doktorantka w sposób szczegółowy charakteryzuje nieoczywisty mechanizm molekularny leżący u jego podłoża, i co istotne, zwraca uwagę na „ciemną stronę” HTG jako zjawiska wywołującego potencjalnie niekorzystne skutki dla biorcy obcego materiału genetycznego.

Praca doktorska mgr A. Wiśniewskiej ma klasyczny układ. Składa się z wykazu skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu teoretycznego, celu pracy, rozdziałów dotyczących materiałów i metod, opisu wyników i ich dyskusji, oraz podsumowania wraz z kończącym dysertację spisem literatury.

We wstępie Doktorantka przedstawia czynniki wpływające na proces transkrypcji, poczynając od czynników sigma, poprzez klasyczne czynniki transkrypcyjne, a na regulatorach transkrypcji skończywszy. Zwraca uwagę na zakres interakcji, czego konsekwencją jest podział na globalne i lokalne (miejscowe) regulatory transkrypcji, które mogą tworzyć sieć wzajemnych powiązań charakteryzujących się hierarchicznością, antagonizmem lub synergią działania. Bardzo ciekawym i ważnym w kontekście prezentowanych wyników jest fragment dotyczący modyfikacji/zakłócenia tych sieci w przypadku pojawienia się „egzogennych” czynników regulujących transkrypcję. Doktorantka wskazuje zarówno odległe jak i daleko idące konsekwencje takiego zdarzenia w zmianie ekspresji genów, co może znajdować odzwierciedlenie zarówno w morfologii jak i fizjologii komórek. W dalszej części wstępu zawarto opis systemów R-M, zwracając uwagę na ich funkcję oraz organizację genetyczną na przykładzie systemu Csp231I, którego białkowy regulator C jest jednym z bohaterów recenzowanej rozprawy.

Wprowadzenie teoretyczne jest zatem bardzo dobrze opracowane i zilustrowane dobrze dobranymi schematami. Przedstawia informacje niezbędne do zrozumienia prezentowanych wyników. Dla pełności obrazu zabrakło w moim przekonaniu informacji o profagach (w tym Rac) jako elementu „uśpionego” fenotypu i swoistej przeciwwagi dla opisywanych systemów R-M.

Cele pracy przedstawione są krótko w postaci trzech szczegółowych zadań badawczych, których realizacja znajduje późniejsze odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach.

Materiały wykorzystane w pracy zostały przedstawione na 10 stronach rozprawy. Oprócz tabel szczepów, konstruktów plazmidowych i oligonukleotydów rozdział ten zawiera ponadto zestawienie i składy podłoży hodowlanych i buforów. Na kolejnych 12 stronach opisano metody badawcze stosowane do otrzymania prezentowanych później wyników. Oba rozdziały (Materiały i Metody) przygotowane są starannie i szczegółowo. Metody dobrane są adekwatnie do założeń badawczych i pośrednio wskazują na biegłość Doktorantki w pracy laboratoryjnej. Do tej części pracy mam dwa pytania; (I) dlaczego w metodzie mutagenyzy miejscowo-specyficznej po PCR oprócz trawienia DpnI stosowano oczyszczanie produktu za pomocą zestawu CleanUp a potem jeszcze izolację z żelu (rozdział 4.2)?, (II) jakie jest uzasadnienie dla stosowania pomiaru stężenia białka w oparciu o intensywność prążka na elektroforezie (rozdział 4.13)? Mam też uwagę do tytułu rozdziału 4.11 „Nadprodukcja białka w systemie bakteriofaga T7”, który w mojej ocenie jest nieprecyzyjny.

Wyniki prezentowane w pracy w sposób chronologiczny i konsekwentny przedstawiają odpowiedzi na pytania nasuwające się z obserwacji efektownego fenotypu *E. coli* będącego efektem wprowadzenia genów systemu R-M Csp231I pochodzącego z bakterii *Citrobacter* sp. RFL231. W toku kompleksowych eksperymentów z wykorzystaniem serii konstruktów plazmidowych oraz odpowiednio dobranych szczepów bakterii, Doktorantka wykazała, że zdolność komórek *E. coli* do filamentacji powiązana jest z obecnością genu białka C (będącego regulatorem ekspresji systemu R-M Csp231I) a nie jak można by upraszczając

przypuszczać z aktywnością restryktazy lub odpowiedzi SOS zależnej od kompleksu RecA. Ponadto, zauważyła, że bakterie z genem białka C rosną wolniej, choć finalnie osiągają podobne OD jak szczep kontrolny i z nieaktywnym genem C. Mam jednak pewne wątpliwości co do przestawienia wyników ilustrujących tę konkluzję (Ryc. 12). Rycina przedstawia wykres zależności CFU/ml od czasu hodowli (10 godzin – czy to jest faza stacjonarna?) a nie OD od czasu, co przy znaczącej zmianie wielkości i kształtu komórek może wpływać na różnice w zależności pomiędzy OD a CFU. Ponadto, oś Y jest nieproporcjonalna w skali (taka sama wartość dla przedziału 0 – 1E+9 i kolejnych, np. 1E+9 – 2E+9) co utrudnia określenie rzeczywistych wartości CFU/ml przez co najmniej pierwsze pięć godzin hodowli.

Przeprowadzone we współpracy badania transkryptomyczne wskazały, że po wprowadzeniu do komórek genu białka C zmianom ulega ekspresja genów w obrębie profaga Rac. Co ciekawe, spośród kilkunastu genów o podwyższonej ekspresji, jedynie ekspresja genu *racR* obniżyła się, co stało się przedmiotem dalszych analiz. W szeregu eksperymentów Doktorantka wykazała, że białko C rzeczywiście jest toksyczne jedynie dla komórek niosących geny profaga Rac, natomiast z czasem owa toksyczność i zdolność bakterii do filamentacji zanika, najprawdopodobniej na drodze mutacji supresorowych, jednak nie w obrębie genu białka C.

W kolejnych badaniach skupiono się na oznaczeniu poziomu białka FtsW zaangażowanego w podziały komórkowe. Stosując fuzję translacyjną z GFP wykazano, że fluorescencja jest widoczna tylko przy aktywnym białku C w kombinacji w obecności rejonu *rac*. Ponadto analiza z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej wykazała nierównomierną akumulację białka FtsW-GFP w obrębie wydłużonej komórki *E. coli*, być może w miejscach inicjacji tworzenia się septy. W kontekście dostępnych jak się domyślam danych z transkryptomiki, prosiłbym tu o komentarz, czy potwierdzają one zwiększoną ekspresję genu *ftsW* i jak po wprowadzeniu genu białka C wygląda poziom ekspresji innych genów, o których wiadomo że ich produkty są zaangażowane w podział komórki?

W pracy doktorskiej przedstawiono również analizy białka RacR, począwszy od rozpowszechniania genu i jego wariantów wśród bakterii, poprzez wykazanie że *racR* hamuje własną transkrypcję z promotora *racR* (zatem jest autorepresorem), aż do otrzymania białka rekombinowanego RacR i eksperymentów typu EMSA i reakcji typu test śladu DNA (ang. footprint), dzięki którym odpowiednio wykazano wiązanie się RacR do miejsca w obrębie promotora własnego genu oraz wyznaczono miejsce wiązania białka RacR do sekwencji nukleotydowej rejonu faga Rac.

Kluczowym wynikiem pracy, który zaakcentowany został również w tytule rozprawy jest jednak wykazanie krzyżowego działania RacR i białka C, które staje się swoistym włącznikiem prowadzącym w konsekwencji do filamentowego fenotypu *E. coli*. Po pierwsze, białko C jest zdolne do redukcji ekspresji *racR*, niemal w takim samym stopniu jak naturalny represor RacR. Następnie wykazano wiązanie się białka C do sekwencji *rac*, aby finalnie zmapować miejsce wiązania. Wyniki te doprowadziły Doktorantkę do kluczowych konkluzji, tj. że, białko

C wiąże się również do sekwencji niepowiązanej z funkcją regulatora C oraz że, położenie tej sekwencji (5'-CTAAG-n5-CTTAA-3') w dużej bliskości od kodonu startu translacji genu *racR* może wywierać negatywny wpływ na ekspresję represora RacR i jego regulonu (w tym prowadzić do derepresji genów *ydaS* i *ydaT*).

Wartość merytoryczną wyników prezentowanych w pracy oraz ich opis oceniam bardzo wysoko. Badania są kompleksowe i przeprowadzone z wykorzystaniem szerokiego wachlarza technik biologii molekularnej, narzędzi bioinformatycznych oraz obrazowania za pomocą mikroskopii. Zastosowane układy eksperymentalne pozwoliły na wykazanie roli białka C i RacR jako czynników transkrypcyjnych i ich kompetycji o miejsce wiązania w obrębie miejsca inicjacji transkrypcji genu *racR*. W toku badań udało się nie tylko odtworzyć filamentacyjny fenotyp bakterii ale również *in vitro* wykazać wiązanie badanych białek do DNA oraz precyzyjnie zidentyfikować sekwencję z którą oddziałują te białka.

Otrzymane wyniki są należycie i szeroko przedyskutowane w kontekście dostępnych danych literaturowych. Doktorantka podaje przykłady innych krzyżowych interakcji niespokrewnionych czynników transkrypcyjnych oraz konsekwencje takiego oddziaływania. Zwraca uwagę, że potencjalnie negatywne skutki takich interakcji są najprawdopodobniej przyczyną eliminacji bakterii z niekorzystnym zestawem genów z populacji (co poparte jest bioinformatyczną analizą genomów *E. coli* pod kątem koegzystencji genu białka C i genów *racR/ydaS/ydaT*). Z drugiej strony celnie zauważa, że przykłady horyzontalnego transferu genów, mogące prowadzić do zmniejszenia żywotności komórek gospodarza, a nawet jego śmierci, mogą być częstsze, lecz niedostrzegane i przez to nie dość wnikliwie badane.

Po lekturze pracy mam pytania, które wynikają z ciekawości naukowej a nie z uchybień czy braków w prezentacji czy interpretacji wyników:

1. Czy funkcjonalna jest krótsza wersja białka C zawierająca tylko 5 helis?
2. Czy wiadomo coś na temat roli *racR/ydaS* skoro z jednej strony geny te klasyfikowane są jako niezbędne dla *E. coli* a z drugiej istnieją szczepy bez progafa Rac więc i bez tych dwóch wspomnianych genów?

Pod względem redakcyjnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Moja jedyna uwaga dotyczy braku informacji o wykorzystaniu materiałów prezentowanych na wielu rycinach jako już wcześniej opublikowanych w *Nucleic Acids Research* w pracach ze współautorstwem Doktorantki (np. ryciny 9, 10 i 19 są odpowiednikami Fig. 1, 5A i 7A w pracy Wiśniewska i wsp., a ryciny 16-18 i 21, 22 są odpowiednikami Fig. 6A-C i 10AB w pracy Negri i wsp.).

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej jest bardzo dobrym opracowaniem prezentującym nowe wyniki o dużej wartości merytorycznej. Uważam, że praca w pełni spełnia wymagania zwyczajowe oraz formalne stawiane w stosownych przepisach prawa (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), dlatego wnoszę do

Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność i wysoką wartość naukową prezentowanych wyników (co potwierdzają publikacje w prestiżowym czasopiśmie Nucleic Acids Research z współautorstwem Doktorantki) oraz wyjątkową staranność opracowania wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.