



dr hab. Mikołaj Olejniczak, prof. UAM

Zakład Biochemii

2016 11. 29

23 listopada 2016, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Grzegorza Cecha zatytułowanej
„Wpływ delekcji genu *hfq* bakterii *Escherichia coli* na
regulację replikacji DNA oraz na rozwój bakteriofaga P1vir”

Praca doktorska Pana mgr Grzegorza Cecha została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz, która specjalizuje się w badaniach związanych m.in. z replikacją plazmidów, cyklem życiowym bakteriofagów, mechanizmami działania alarmonów bakteryjnych oraz sposobami kontroli wzrostu bakterii. Temat rozprawy doktorskiej, która dotyczy roli białka opiekuńczego Hfq w regulacji replikacji plazmidowego oraz fagowego DNA, bardzo dobrze wpisuje się w tę tematykę.

Celem badań pracy było wyjaśnienie udziału białka opiekuńczego Hfq w procesach związanych z metabolizmem DNA na przykładzie replikacji wybranych plazmidów oraz namnażania bakteriofaga P1vir. Rola białka Hfq w metabolizmie RNA jest już od dawna obiektem intensywnych badań dotyczących m.in. udziału tego białka w stabilizacji regulatorowych cząsteczek RNA, promowania oddziaływań niekodujących RNA z regulowanymi przez nie cząsteczkami mRNA, oddziaływań z innymi białkami, a także bezpośredniego udziału w regulacji translacji. Białko Hfq jest szczególnie ważne dla działania regulatorowych RNA, które są kodowane w *trans* względem kontrolowanych przez nie genów, jednakże bierze udział także w regulacji transpozycji z udziałem *cis*-kodowanych RNA-IN oraz RNA-OUT. Udział białka Hfq w procesach związanych z metabolizmem DNA jest jednak jeszcze słabo poznany, co stanowi o szczególnym znaczeniu badań podjętych przez Doktoranta w recenzowanej pracy.

Praca doktorska Pana mgr Grzegorza Cecha ma układ typowy dla publikacji naukowej, z podziałem na wprowadzenie, opis stosowanych materiałów i metod, omówienie wyników, dyskusję, wnioski oraz referencje literaturowe. Praca została napisana językiem klarownym i logicznym. Wprowadzenie literaturowe kompetentnie



wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z rolą białka Hfq w regulacji ekspresji genów, mechanizmami replikacji DNA u bakterii oraz cyklem życiowym bakteriofaga P1. Szczególna uwaga poświęcona jest omówieniu badań dotyczących bezpośredniego oddziaływania białka Hfq z DNA.

Badania nad rolą Hfq w metabolizmie DNA zostały rozpoczęte przez Doktoranta od analizy fenotypów mutantów *E.coli* z delecją genu *hfq* w oparciu o dane uzyskane z zastosowaniem mikromacierzy. Analiza ta obejmowała prawie 2 tysiące indywidualnych testów fenotypowych, czyli 20-krotnie więcej niż w uprzednio prowadzonych badaniach tego typu. Uzyskane wyniki potwierdziły plejotropowy efekt delecji genu *hfq*, wykazując różnice w ponad 200 fenotypach biochemicznych. Stwierdzono większą aktywność metaboliczną mutanta („zysk fenotypu”) pod względem utylizacji różnych źródeł azotu, węgla, fosforu i siarki, a także podwyższoną wrażliwość („utrata fenotypu”) na czynniki stresu osmotycznego, zmiany pH, oraz na szereg związków chemicznych, m. in. liczne antybiotyki. Zaobserwowano również podwyższoną wrażliwość na związki interferujące z metabolizmem DNA, m.in. czynniki utleniające, interkalujące oraz inhibitory syntezy. Jednocześnie stwierdzono, że delecja *hfq* nie wpływa na procesy biosyntetyczne, min. związane z syntezą prekursorów DNA. Wyniki tych badań są interesujące oraz poszerzają istotnie stan wiedzy na temat efektów fenotypowych wynikających z braku białka Hfq w komórce. W trakcie obrony poprosiłbym Doktoranta o krótką dyskusję o tym, w jaki sposób interpretuje obserwowany zysk lub utratę fenotypu, czy np. można te dane interpretować bezpośrednio w kategoriach represji lub aktywacji odpowiednich genów przez Hfq?

Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób obserwowane zmiany fenotypowe są powiązane z metabolizmem DNA, Doktorant przeprowadził badania zmian transkryptomu w szczepie z delecją genu *hfq*. W przypadku ok. 50 genów związanych z metabolizmem DNA stwierdzono zmiany poziomu ekspresji o co najmniej 10%. Szczególnie duży efekt zaobserwowano w przypadku genu kodującego białko LrhA, które uczestniczy w regulacji genu *rpoS* przy pomocy Hfq-zależnego sRNA RprA, a także w przypadku genu kodującego białko AsnA. W tym drugim przypadku ewentualna rola białka Hfq nie jest znana. Ponadto zaobserwowano mniejsze zmiany w ekspresji genów bezpośrednio związanych m.in. z replikacją i naprawą DNA. Warto zauważyć, że



gen *mutS*, który wykazuje się wzrostem poziomu ekspresji w mutancie *hfq*, jest regulowany negatywnie przez sRNA SdsR, które należy do sRNA zależnych od Hfq (Gutierrez *et al.*, Nature Communications 2013).

Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób białko Hfq uczestniczy w procesach związanych z metabolizmem DNA Doktorant postanowił zmierzyć kinetykę wbudowywania radioaktywnej tymidyny podczas replikacji chromosomowego DNA oraz replikacji plazmidu z chromosomalnym miejscem inicjacji replikacji *oriC*. Wyniki badań wskazały, że zarówno replikacja chromosomowego DNA jak i DNA plazmidu z *oriC* przebiega efektywniej w mutancie *hfq*, niż w szczepie dzikim, szczególnie w środkowej części fazy logarytmicznej.

W następnym etapie Pan mgr Cech objął swoimi badaniami szereg plazmidów posiadających różne miejsca inicjacji replikacji, w tym różne plazmidy typu ColE1, pSC101 oraz posiadające fagowe miejsca inicjacji replikacji. Wstępną charakterystykę roli białka Hfq w ich replikacji wykonał mierząc wydajność transformacji tymi plazmidami komórek z delecją *hfq* oraz komórek dzikich. Zmiany wydajności transformacji mogą świadczyć o zmianach w replikacji lub zatrzymywaniu transformowanych plazmidów. W przypadku sześciu z badanych tą metodą plazmidów efektywność transformacji w szczepie z delecją *hfq* była obniżona, w dwóch niezmienną a w jednym (pUC18) znacznie podwyższoną. Ponieważ pUC18 zawiera delecję genu *rom* kodującego białko opiekuńcze niezbędne dla kontroli replikacji plazmidu z udziałem *cis*-kodowanych RNA I i RNA II wynik ten może świadczyć o interakcjach pomiędzy mechanizmami regulacji związanymi z *rom* oraz z *hfq*.

Następnie Doktorant bezpośrednio porównał kinetykę replikacji plazmidów z różnymi sekwencjami inicjacji replikacji mierząc inkorporację radioaktywnej tymidyny. Wyniki tych badań wykazały większą syntezę DNA w mutancie *hfq* w przypadku wszystkich badanych plazmidów typu ColE1, w tym także plazmidu pUC18, przy czym różnica ta była szczególnie duża w środkowej części fazy logarytmicznej. W przypadku plazmidów pochodnych pSC101 różnice były mniejsze i dotyczyły jedynie późnej fazy logarytmicznego wzrostu. Natomiast w przypadku minireplikonów pochodzących od



bakteriofagów obserwowano różnorodne efekty, przy czym w przypadku pochodnej faga P1 największe różnice obserwowano na początku fazy logarytmicznego wzrostu.

W ostatnim etapie prac Doktorant podjął się zbadania roli *hfq* w replikacji faga P1vir w komórkach *E.coli*. Analiza morfologii łysek fagowych wykazała słabszy rozwój bakteriofaga w szczepie z delecją *hfq*. Analiza transkryptomu *E.coli* podczas infekcji pokazała, że liczba genów gospodarza, których ekspresja uległa zmianie jest niższa w przypadku mutanta *hfq*. Stwierdzono także różnice w zmianach ekspresji genów fagowych podczas infekcji komórek dzikich oraz komórek z delecją *hfq*.

Podsumowując, w swojej rozprawie doktorskiej Pan mgr Grzegorz Cech podjął bardzo interesujący problem biologiczny dotyczący roli białka Hfq w metabolizmie DNA na przykładach różnych jednostek replikacyjnych. Wyniki jego badań wskazują na znaczenie białka Hfq dla przebiegu procesów związanych z replikacją DNA u bakterii, natomiast otwarte pozostaje pytanie, co do mechanizmów działania białka Hfq w tych procesach. Myślę, że warto byłoby, aby Doktorant w czasie obrony przedyskutował możliwe sposoby wyjaśnienia mechanizmów działania Hfq prowadzących do obserwowanych efektów fenotypowych. W tym kontekście interesuje mnie szczególnie czy obserwowane efekty delecji genu *hfq* związane z metabolizmem DNA mogłyby być wytłumaczone przez udział białka Hfq w regulacji translacji lub stabilności odpowiednich mRNA za pośrednictwem niekodujących RNA.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie Panu mgr Grzegorzowi Cechowi stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie mikrobiologia. Jednocześnie ze względu na wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Mikołaj Olejniczak