

2016 01. 07

INSTYTUT



BiolMed

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

w Łodzi

93-232 Łódź  
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723610  
fax.:042 2723630

e-mail: [jdziadek@cbm.pan.pl](mailto:jdziadek@cbm.pan.pl)  
[www.cbm.pan.pl](http://www.cbm.pan.pl)

wtorek, 5 stycznia 2016

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium  
Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Sylwii Bloch pt. „Mechanizm kontroli ekspresji genów w regulacji rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych”.**

Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn i kierowany przez niego zespół katedry Biologii Molekularnej to uznany na świecie autorytet w dziedzinie fagów lambdoidalnych. Realizacja pracy doktorskiej w takim zespole stawia przed Doktorantką oczekiwania, rozwiązania istotnych problemów naukowych oraz wniesienia znaczącego wkładu w badane przez nią zagadnienia. Z drugiej strony Doktorantka miała do dyspozycji bogaty, wyszukany warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową i co najważniejsze wiedzę i doświadczenie naukowe promotora. Bardzo miło mi, jako recenzentowi, po lekturze pracy doktorskiej stwierdzić, że te wysokie oczekiwania zostały w pełni spełnione.

Pracę doktorską Pani mgr Sylwii Bloch stanowi zbiór bardzo spójnych tematycznie pięciu prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie o sumarycznym współczynniku cytowalności  $IF > 15$  oraz jednej pracy przeglądowej. W trzech z pięciu prac eksperymentalnych oraz w pracy przeglądowej, Doktorantka jest pierwszym, a w pozostałych dwóch, drugim autorem. Dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do jej kluczowej roli w realizacji opisywanych badań. Praca przeglądowa opublikowana w *Acta Biochimica Polonica* w roku 2012 stanowi doskonały wstęp teoretyczny i tło naukowe do badań własnych autorki. W pracy tej autorki opisują szczep *E. coli* O104:H4 należący do patotypu STEC, który był odpowiedzialny za epidemię w północnych Niemczech w roku 2011, której skutkiem były 54 przypadki śmiertelne. Cechą charakterystyczną szczepów STEC, będących przyczyną zatruc pokarmowych, jest ich zdolność do produkcji toksyny Shiga, której geny zlokalizowane są w genomach lambdoidalnych fagów Stx, występujących w tych bakteriach w





postaci profagów. Znaczną część tej publikacji autorzy poświęcają obecnie wykorzystywanym metodom detekcji szczepów STEC. Ponadto z ogromną znajomością tematu autorzy zwracają uwagę, że w świetle epidemii wywołanej przez szczep O104:H4 obowiązujące metody diagnostyczne są niewystarczające oraz proponują oparcie nowych metod o identyfikację ruchomych elementów genetycznych, przede wszystkim fagów Stx noszących geny toksyny Shiga. Całkowicie zgadzam się z Doktorantką, że w świetle wiedzy o horyzontalnym transferze genów, oparcie diagnostyki o detekcję najczęstszych patogennych serotypów jest niewłaściwą strategią i powinno zostać zastąpione identyfikacją genów kodujących najważniejsze toksyny.

**Czy obecnie, 5 lat po epidemii w Niemczech, dostępna jest już wystandaryzowana metoda diagnostyczna pozwalająca na identyfikację szczepów STEC?** Dwie pierwsze, z przedstawionych do oceny prac eksperymentalnych, dotyczą badania znaczenia regionu *exo-xis* w cyklach litycznym i lizogenicznym bakteriofagów Stx i faga  $\lambda$ . Praca opublikowana w roku 2013 w Archives of Microbiology pokazała, że obecność regionu *exo-xis* na wielokopijnym plazmidzie osłabia zdolność badanych fagów do wbudowywania się do genomu bakterii, wzmacnia natomiast indukcję cyklu litycznego. Zwielenokrotnienie kopii tego regionu nie wpływało natomiast na adsorpcję fagów do komórek gospodarza. Praca ta jasno pokazała, że przynajmniej niektóre geny obszaru *exo-xis*, których produkty w większości nie zostały dotąd scharakteryzowane, uczestniczą w regulacji procesu lizogenizacji oraz indukcji cyklu litycznego. Ciekawą obserwacją poczynioną w tej pracy była także różna odpowiedź profagów  $\lambda$  i  $\phi_{24B}$  na indukcję mitomycyną C i nadtlakiem wodoru. Znacznie dalej autorzy poszli w swoich badaniach w pracy opublikowanej w PLOS One w 2014 roku. Znaczenie roli zwielenokrotnienia kopii regionu *exo-xis* badano również z zastosowaniem sekwencji noszących w genach tego obszaru punktowe mutacje zmiany ramki odczytu, co pozwoliło na wykazanie, że obserwowane różnice w cyklach litycznym i lizogenicznym, przynajmniej częściowo wynikają z obecności funkcjonalnych genów a nie wyłącznie obszaru DNA wysycającego wiążące je białka. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano zwiększoną ilość fagowego DNA oraz obniżoną przeżywalność bakterii po indukcji profagów w obecności dodatkowych kopii *exo-xis*, co pokazało że obszar ten wzmacnia rozwój zarówno bakteriofaga  $\lambda$  jak i  $\phi_{24B}$  po indukcji. Zastosowanie ilościowej oceny mRNA pozwoliło na ocenę ekspresji genów regionu *exo-xis* zarówno w zainfekowanych komórkach gospodarza jak i podczas indukcji cyklu litycznego. W obu przypadkach profil transkrypcyjny był odmienny. Obserwowano również odmienne profile





transkrypcyjne dla obu badanych fagów, mimo identyfikacji podobnych sekwencji promotorowych i terminatorowych. Bardzo interesującą obserwacją było wykazanie zwiększonej ekspresji genów *orf73* i *ea22* faga  $\phi 24_B$  wyłącznie podczas indukcji nadtlaniem wodoru, czego nie obserwowano podczas indukcji mitomycyną C. Odmienne wyniki uzyskane dla indukcji MMC i  $H_2O_2$ , zarówno w badaniach opartych o dodatkowe kopie regionu *exo-xis* jak i w analizach poziomu transkrypcji genów tego obszaru, sugerują różny mechanizm indukcji cyklu litycznego dla obu użytych induktorów. MMC, uszkadzając silnie DNA, prawdopodobnie prowadzi do indukcji systemu SOS, który reguluje cykl lityczny poprzez autoproteolizę fagowego represora cI. **Czy zastosowane w badaniach dawki nadtlenu wodoru indukują również odpowiedź komórki typu SOS? Czy indukcja profagów w szczepie *recA*<sup>-</sup> z zastosowaniem MMC i/lub  $H_2O_2$  dałyby profil transkrypcyjny uzyskany w badaniach podczas indukcji MMC czy nadtlaniem wodoru?** Ciekawą byłaby również próba identyfikacji białek regulatorowych wiążących się do obszaru *exo-xis* (przynęta) w komórkach zawierających profagi, nieindukowanych oraz indukowanych każdym z użytych mutagenów. **Bardzo proszę Doktorantkę o skomentowanie celowości przeprowadzenia takich eksperymentów.**

W kolejnej przedstawionej do oceny pracy, opublikowanej w *Toxins* w roku 2015, Doktorantka w bardzo dobrze zaplanowanych i wykonanych badaniach wykazała, że wiriony pięciu badanych fagów Stx są bardziej wrażliwe na promieniowanie UV niż wiriony bakteriofaga  $\lambda$ . Zastosowane dawki promieniowania, zbyt niskie dla znaczącego uszkodzenia materiału genetycznego, obniżały znacząco aktywność fagów Stx w tym obniżały ekspresję genów *N* i *cro* niezbędnych dla cyklu litycznego. Przeprowadzone badania wykazały wpływ materiału genetycznego z najbardziej wrażliwych fagów ( $\phi 24_B$ , P27) oraz uszkodzenia kapsydów obserwowane w mikroskopii elektronowej. W tej niezwykle ciekawej pracy mającej aspekty aplikacyjne niejasny jest dla mnie jedynie wybór temperatur  $37^{\circ}C$  i  $43^{\circ}C$ , które miały, jak piszą autorzy, odpowiadać fizjologicznej temperaturze dla *E.coli* podczas infekcji. Kontakt samych bakteriofagów, lub zainfekowanych bakterii, z promieniowaniem UV raczej nie następuje w organizmie gospodarza, w temperaturze  $37^{\circ}C$ , lecz w warunkach pozaustrojowych, w temperaturze otoczenia gdzie organizmy te narażone są na promieniowanie słoneczne czy też sterylizacje UV. **Czy w warunkach niższej temperatury obserwowany efekt uszkodzenia bakteriofagów Stx mógłby ulec zasadniczym zmianom ?**





W pracy opublikowanej w *Journal of General Virology* w 2015 roku, autorzy wykazali, że inaktywacja poli(A) polimerazy w komórkach gospodarza, enzymu odpowiedzialnego za poliadenylację RNA, znacząco osłabia cykl lityczny i lizogeniczny bakteriofagów Stx, w mniejszym stopniu wpływając na faga  $\lambda$ . Autorzy analizowali również poziom ekspresji genu *pcnB* obserwując jego znaczącą indukcję w obecności MMC wyłącznie w komórkach zawierających lizogenne fagi. Uzyskane wyniki jasno wskazały na udział procesu poliadenylacji RNA w regulacji rozwoju fagów Stx oraz zależność ekspresji poli(A) polimerazy od obecności profagów. **Czy Doktorantka planuje badania zmierzające do identyfikacji fagowych czynników regulujących ekspresję genu *pcnB*? Czy zmiany w lizogenii oraz cyklu litycznym fagów Stx w gospodarzu ze zinaktywowaną poli(A) polimerazą wynikają z zahamowania procesu poliadenylacji transkryptów genów fagowych i ich zmienionej stabilności czy też z szerszych zmian w stabilności transkryptów genów gospodarza? Czy znane są zmiany w transkrypcji mutanta *E.coli* po inaktywacji genu *pcnB*?**

W przedstawionym do oceny dorobku Doktorantki znajduje się również praca opublikowana w *Scientific Reports* w 2015 roku, gdzie autorzy zidentyfikowali microRNA, powstałe w wyniku cięcia większego transkryptu, zaangażowane w regulację lizogenii, indukcję cyklu litycznego i adsorpcji na powierzchni komórek gospodarza, faga  $\phi 24_B$ . O znaczeniu naukowym tego odkrycia świadczy fakt, że zidentyfikowana cząsteczka to pierwszy microRNA organizmów prokariotycznych, dla którego określono funkcję biologiczną. Pod względem metodycznym, praca ta, to doskonały przykład zastosowania sekwencjonowania nowej generacji dla identyfikacji cząsteczek sRNA specyficznych dla gospodarza i badanego faga. Jediną fagową cząsteczką microRNA, którą udało się zidentyfikować był 20 nukleotydowy oligorybonukleotyd (24B\_1), powstały po cięciu 80 nukleotydowego prekursora. Konstrukcja mutanta pozbawionego obszaru 24B\_1 pozwoliła na identyfikację biologicznej roli zidentyfikowanej cząsteczki regulatorowej, której brak upośledzał lizogennie, powodował szybszą indukcję i większą wydajność cyklu litycznego oraz słabszą adsorpcję faga na komórkach gospodarza. Obserwowany efekt potwierdzono poprzez komplementację mutanta usuniętym wcześniej fragmentem DNA. Analizy *in silico* oraz badanie poziomu transkrypcji pozwoliły wykazać rolę 24B\_1 jako negatywnego regulatora ekspresji antyrepresora *d\_ant*. Oprócz 24B\_1 autorzy zidentyfikowali szereg microRNA gospodarza. **Czy wśród tych cząsteczek znaleziono**



**cząsteczki obecne wyłącznie w szczepie lizogennym? Czy zidentyfikowano już geny, których transkrypty mogą być regulowane przez te cząsteczki ?**

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że w każdej z opublikowanych prac wchodzących w skład pracy doktorskiej Pani Sylwii Bloch dyskusja przeprowadzona jest w sposób bardzo profesjonalny, świadczący o świetnej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań. Na podkreślenie zasługuje także świetny warsztat badawczy Doktorantki, umiejętność doboru właściwych kontroli eksperymentów oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

#### **Podsumowanie:**

**Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Sylwii Bloch uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Sylwii Bloch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane niezwykle cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani Sylwii Bloch przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik

Instytut Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

prof. dr hab. Jarosław Dziadek