

20 12 21

Łódź, 16.12.2015 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Zakład Immunobiologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Sylwii Bloch**

Tytuł rozprawy : „Control mechanism of gene expression during development of lambdoid bacteriophages” (“Mechanizmy kontroli ekspresji genów w regulacji rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych”)

Rozprawa doktorska mgr S. Bloch została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna i promotora pomocniczego dr Bożeny Nejman-Faleńczyk.

Celem pracy doktorskiej mgr S. Bloch były badania mechanizmów kontrolnych ekspresji genów podczas rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych. Rozprawę stanowi cykl prac, na który składają się jeden artykuł przeglądowy i pięć prac doświadczalnych, wszystkie opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z ustalonym współczynnikiem wpływu tj. *Impact Factor* (IF). Prace te zostały wydane w latach 2012-2015. W rozprawie doktorskiej oprócz tych prac zamieszczono *Abstract* w języku angielskim i *Streszczenie* w języku polskim oraz *Oświadczenia* współautorów o wkładzie w ich powstanie i opublikowanie.

Fagi lambdoidalne, z przedstawicielem bakteriofagiem λ , stanowią modelowy mikroorganizm w biologii molekularnej. Zainteresowanie nimi wynika też z roli jaką odgrywają w selekcji wirulentnych szczepów bakterii. W

genomach fagów lambdoidalnych zlokalizowane są geny kodujące wytwarzanie toksyn. Przykładem takich bakteriofagów są fagi Stx z genami toksyn Shiga. Bakterie *Escherichia coli* z profagami niosącymi te geny (STEC) są patogenami, wywołującymi zatrucia pokarmowe szczególnie groźne dla dzieci i osób starszych, a nowe szczepy STEC pojawiają się w następstwie horyzontalnego transferu genów. Opisanym niedawno przykładem może być ujawnienie się szczepu *E. coli* O104:H4 wytwarzającego toksyny Shiga, który wywołał epidemię w 2011 r.

Fag λ jak i fagi Stx to fagi łagodne, zdolne do rozwoju w cyklu litycznym jak i lizygenicznym, o czym decyduje wiele czynników środowiskowych oraz stan fizjologiczny bakterii gospodarza. W cyklu lizygenicznym profag w postaci zintegrowanego z genomem bakterii genomu faga, ulega replikacji wraz z DNA komórki gospodarza. W tym czasie ekspresja większości genów faga jest zahamowana, za co odpowiedzialne jest białko cI – represor faga λ . Białko to ulega autoprotolizie po indukcji profaga do przejścia w cykl lityczny, nie może więc pełnić roli represora i dochodzi do wycięcia profaga z genomu bakterii i procesu prowadzącego do cyklu litycznego faga. Przejściu faga ze stanu lizogenii do cyklu litycznego towarzyszy ekspresja genów *stx* i w konsekwencji wytwarzanie toksyn Shiga, których działanie objawia się krwawymi biegunkami u osób zakażonych i może skutkować wystąpieniem zespołu hemolityczno-mocznicowego. Biorąc pod uwagę konsekwencje działania toksyn Stx szczególnie ważne jest poznanie procesów regulacji ekspresji genów fagów lambdoidalnych. To cel pracy mgr S. Bloch, która podjęła badania dwóch bakteriofagów λ i $\Phi 24_B$, jednego z fagów Stx. Taki wybór obiektów badań pozwolił Doktorantce na porównanie procesów regulacji cykli życiowych faga modelowego (λ) i noszącego geny toksyn Shiga ($\Phi 24_B$).

W pierwszej pracy eksperymentalnej rozprawy Doktorantka podjęła badania znaczenia genów fagów λ i $\Phi 24_B$ zlokalizowanych w rejonie *exo-xis* tj. pomiędzy genami *exo* i *xis*. Wykazała, iż w warunkach nadekspresji rejonów

exo-xis tych fagów obserwuje się wzrost liczby cząstek fagowych i poziomu fagowego DNA po indukcji profagów, zarówno mitomycyną C jak i nadtlaniem wodoru.

W kolejnej pracy mgr S. Bloch, posługując się techniką PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) stwierdziła, iż profil ekspresji genów fagowych i otwartych ramek odczytu (ORF) zlokalizowanych w regionie *exo-xis* zależy od zastosowanego czynnika indukującego cykl lityczny (mitomycyna C, nadtlanie wodoru) oraz badanego faga. Wykazała, iż profil genów ulegających ekspresji obu fagów był odmienny, co sugeruje, iż pomimo dużego podobieństwa regionów *exo-xis* badanych fagów, regulacja ekspresji genów tego regionu może się różnić.

Sugestia ta została potwierdzona w kolejnej obserwacji przedstawionej w czwartej pracy eksperymentalnej. Doktorantka sprawdziła wpływ promieniowania UV na stabilność wirionów fagów lambdoidalnych oraz ich zdolność do zakażenia komórek *E. coli*. Mgr S. Bloch wykazała, iż wiriony fagów Stx (zbadala 5 fagów) są bardziej wrażliwe na działania promieniowania ultrafioletowego w porównaniu do faga λ . Posługując się techniką mikroskopii elektronowej wykazała, iż obserwowane różnice wynikają z uszkodzeń kapsydów faga $\Phi 24_B$. Ponadto Doktorantka stwierdziła, iż poziom ekspresji genów *N* i *cro* po infekcji *E. coli* był znacznie obniżony, kiedy fagi Stx uprzednio traktowano UV, w porównaniu do ekspresji tych genów fagów nietraktowanych UV. To także potwierdziło pierwotne obserwacje, iż badane fagi λ i $\Phi 24_B$ charakteryzują się odmiennymi mechanizmami regulacji procesów życiowych.

W kolejnej pracy Doktorantka badała wpływ poliadenylacji RNA na regulację ekspresji badanych fagów λ i $\Phi 24_B$ podczas ich cyklu litycznego. W tych badaniach wykorzystano mutantą *E. coli* niezdolnego do syntezy enzymu PAPI [(poliA) polimeraza I], białka odpowiedzialnego z przyłączanie reszt

adeniny do końca 3' mRNA. Stwierdzono odmienny poziom ekspresji genów faga $\Phi 24_B$ w tym mutancie *E. coli*, w porównaniu z ekspresją genów faga λ .

Za duży sukces badań podjętych w rozprawie doktorskiej należy uznać odkrycie regulatorowej fagowej cząsteczki mikroRNA 24B_1, której obecność wykazano w komórkach *E. coli* podczas indukcji profaga $\Phi 24_B$. Sekwencja kodująca cząstkę 24B_1 nie występuje w genomie faga λ . Zidentyfikowano dwa potencjalne miejsca wiązania dla cząstek 24B_1, jedno z nich znajduje się w regionie sekwencji genu *d_ant*, kodującej białko pełniące rolę anty-represora faga. Wykazano, iż usunięcie z genomu faga sekwencji kodującej 24B_1 prowadzi m.in. do obniżenia wydajności procesu lizogenizacji bakterii, zwiększenia liczby potomnych cząstek fagowych podczas cyklu litycznego i obniżenia adsorpcji fagów na powierzchni komórek gospodarza. Po infekcji bakterii *E. coli* mutantem faga $\Phi 24_B \Delta 24B_1$ (mutant delecyjny bez sekwencji kodującej 24B_1) obserwowano znaczne podwyższenie ekspresji szeregu kluczowych genów fagowych, w porównaniu ze szczepem zainfekowanym fagiem typu dzikiego. Wskazuje to na rolę mikroRNA 24B_1 jako negatywnego regulatora ekspresji genu *d_ant*, kodującego białko wpływające na aktywność represora cI w komórce. Biorąc pod uwagę rolę tego białka można było stwierdzić, iż cząstka 24B_1 ma znaczenie w wyborze jednej z dwóch możliwych dróg rozwoju faga, cyklu litycznego lub lizogenii.

Podsumowując należy stwierdzić, iż Doktorantka uzyskała ważne, znaczące wyniki wskazujące na różnice w molekularnych mechanizmach kontroli ekspresji genów fagów labdoidlanych λ i $\Phi 24_B$, ich cykli rozwojowych, pomimo dużego podobieństwa w sekwencji i organizacji genomów tych fagów. Doktorantka wykazała, iż na kontrolę ekspresji genów mogą mieć wpływ zarówno czynniki zewnętrzne, ale też mechanizmy regulacyjne ekspresji genów fagowych mogą zależeć od czynników wewnętrznych komórek gospodarza. Mgr S. Bloch zrealizowała postawione cele pracy doktorskiej, a uzyskane przez nią wyniki rozszerzają znacząco naszą

wiedzę o regulacji cykli rozwojowych fagów lambdoidalnych, mogą też być w przyszłości podstawą zastosowania w praktyce tj. opracowania efektywnych metod hamowania ekspresji genów *stx*, a tym samym inhibicji wytwarzania toksyn Shiga przez *E. coli*.

Jak wspomniałem wyżej wyniki badania mgr S. Bloch zostały opublikowane w 5 publikacjach oryginalnych w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej *Arch. Microbiol.* IF 1,667, pkt. MNSW 20; *PloS One* IF, 3,234, pkt. MNSW 40; *Toxins* IF 2,938, pkt. MNSW 30; *J. Gen. Virol.* IF 3,183, pkt. MNSW 35; *Scientific Report* IF 5,578, pkt. MNSW 40. Zbiór tych prac uzupełnia bardzo ciekawy, wartościowy artykuł przeglądowy na temat *E. coli* O104:H4. W nim Doktorantka ze współautorkami przedstawia charakterystykę szczepów *E. coli* wytwarzających toksyny Shiga, ich cechy charakterystyczne i właściwości. Szczegółowo opisuje wybuch epidemii w Niemczech w 2011 r., spowodowany tym szczepem bakterii. Krytycznie przedstawia też obecnie stosowane procedury identyfikacji szczepów STEC oraz wskazuje na potrzebę wykorzystania metod molekularnych, uwzględniających wykrywanie charakterystycznych cech tych szczepów, zlokalizowanych na fagach. Artykuł ten został opublikowany w *ABP* IF 1,155, pkt. MNSW 15.

Osiągnięcia mgr S. Bloch stanowiące jej rozprawę doktorską zostały już ocenione przez recenzentów powołanych przez redakcje czasopism w których zostały opublikowane. Są to czasopisma wysoko cenione w środowisku mikrobiologów i biologów molekularnych, stawiające przed autorami nadsyłanych prac wysokie wymagania. 6 prac, z których Doktorantka jest w 4 pierwszym autorem, a w 2 drugim zyskały uznanie recenzentów wspomnianych redakcji, co wskazuje na wartość otrzymanych przez nią wyników badań.

Prace stanowiące rozprawę doktorską mgr S. Bloch zostały opublikowane we współautorstwie. Doktorantka przedstawiła oświadczenia swoje i współautorów o wkładzie w publikacje. Mgr S. Bloch ma przeważający udział w tych pracach. Polegał on na projektowaniu na badań, wykonywaniu

większości doświadczeń, interpretacji ich wyników i udziale w przygotowaniu manuskryptów. Pozostali współautorzy prac przedstawiają swoje udziały w stosowanych oświadczeniach, potwierdzając decydujący wkład Doktorantki w ich powstanie, co pozwala uznać te publikacje za jej rozprawę doktorską.

Podczas obrony proszę Doktorantkę o odniesienie się dwóch kwestii poruszonych w publikacjach i podniesionych w autoreferacie wyników.

- 1) Mgr S. Bloch ze współautorkami w pracy przeglądowej, wskazuje na potrzebę zastosowania metod molekularnych identyfikacji szczepów STEC w oparciu o charakterystyczne cechy tych bakterii związane z fagami Stx.
- 2) W końcowym fragmencie autoreferatu wyników (Streszczenie str. 18) mgr S. Bloch wyraża sugestię, iż uzyskane przez nią wyniki mogą „w przyszłości przyczynić się do opracowania efektywnych metod hamujących produkcję toksyn Shiga przez szczepy STEC oraz leków skierowanych przeciwko tym patogenom”.

Bardzo proszę o wskazanie praktycznych działań, które pozwoliłyby na zrealizowanie tych sugestii. t

Praca doktorska mgr S. Bloch była finansowana z grantów MNSW i NCN, doktorantka uzyskała też stypendia z funduszy UE Programu „Kapitał Ludzki”.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Sylwii Bloch pt. „Control mechanism of gene expression during development of lambdoid bacteriophages” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A. Działko