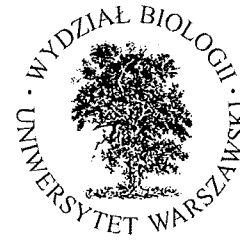


wp. 4.12.2019



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 30.11.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kozłowskiej, pt.

„Strategie regulacji formowania makromolekularnych kompleksów inicjujących proces replikacji DNA fagów niosących geny toksyn Shiga”

**wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,
pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna**

Bakteriofag Lambda odegrał ważną rolę w rozwoju biologii molekularnej, bowiem jego analiza przyniosła wiele podstawowych informacji o przebiegu ważnych procesów biologicznych, takich jak replikacja, transkrypcja i rekombinacja materiału genetycznego, a także o mechanizmach decydujących o wyborze alternatywnych dróg rozwojowych bakteriofagów. Ten modelowy wirus stanowi doskonałe odniesienie dla innych pokrewnych fagów, określanych jako lambdoidalne, które zyskały na znaczeniu dzięki zaangażowaniu w wirulencję wielu patogennych szczepów bakterii, m.in. z rodzajów *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* czy *Shigella*. Genomy fagów lamdoidalnych mają podobną organizację genetyczną oraz zachowaną, w dużym stopniu, sekwencję nukleotydową, co sugeruje, że molekularne mechanizmy odpowiadające za przebieg kluczowych etapów rozwoju tych fagów mogą być podobne. Wszelkie odstępstwa od modelowego Lambda, np. różnice w sekwencjach genów pełniących istotną rolę w biologii fagów, są w tym przypadku szczególnie interesujące, bowiem mogą determinować swoisty sposób funkcjonowania poszczególnych typów bakteriofagów. Zmiany te nabierają większego znaczenia wówczas, gdy dotyczą komponentów warunkujących przebieg replikacji genomu wirusa, a więc procesu odgrywającego ważną rolę w determinowaniu wirulencji przez niektóre fagi lambdoidalne.

Modelem badawczym w ocenianej rozprawie są dwa fagi Stx (P27 i 933W) kodujące toksyny Shiga, które są głównym czynnikiem wirulencji grupy szczepów patogennych EHEC. Natomiast inspiracją skłaniającą do podjęcia badań była obserwacja wskazująca na pewne

różnice w budowie systemów replikacyjnych bakteriofagów Lambda i Stx. Fagi Stx zawierają w obrębie *origin* dodatkowe iterony, co, ze względu na usytuowanie *origin*, skutkuje również pojawieniem się kilkunastu dodatkowych aminokwasów w sekwencjach białek inicjacyjnych tych fagów. Zmiany te mogą potencjalnie wpływać na sposób formowania kompleksów białkowych i nukleoproteinowych podczas inicjacji replikacji genomów fagów, zatem zbadanie mechanizmów tworzenia tych kompleksów, w odniesieniu do modelowego faga Lambda, uważam za w pełni zasadne. Stanowi to również zasadniczy cel naukowy, jaki Doktorantka sformułowała w rozprawie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy ona 101 stron i została opatrzona 46 rycinami i 16 tabelami. Układ rozprawy jest prawidłowy – typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym, zawiera więc charakterystyczne dla takich opracowań rozdziały, tj. *Streszczenie* (również w języku angielskim), *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie* oraz spis cytowanej literatury. W pracy zamieszczono także *Wykaz stosowanych skrótów*, *Spis tabel i rycin* oraz informację na temat źródła finansowania badań.

Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że w rozprawie znalazłem sporo uchybień natury redakcyjnej i językowej. Są to m.in. (a) liczne błędy interpunkcyjne, (b) literowe (np. specjalizacj - str. 9; replikacyjnym - str. 14; przeprowadzenie, str. 20; rozpoczelał; plasmid - str. 61; dimerizacja - str. 75; zayginać - str. 78; białkek - str. 89; takiego - str. 89), oraz (c) niezręczne określenia, np. kolejny krok wykonałam w analogiczny sposób” (np. str. 35), „zostało to opisane w poprzednim kroku oczyszczania” (str. 36) – w języku polskim są znacznie lepsze warianty tłumaczenia angielskiego słowa „step”. Inne przykładowe niedociągnięcia to:

- „sekwencje powtarzalne” (str. 18), zamiast sekwencje powtórzone,
- „defosforylowany plazmid pUC18” (str. 30), defosofrylowane są końce 5' liniowej formy plazmidowego DNA,
- „geny O z ogonkami 6x histydynowymi na końcu C-terminalnym” (str. 54) - powinno być geny kodujące znacznik histydynowy na końcu 3',
- „cykl życia bakteriofagów” (str. 13), powinno być cykl rozwojowy bakteriofagów,
- „indukcja termalna” (str. 88), powinno być termiczna,
- określenie kółko w kółko (str. 15), odnoszące się do modelu replikacji, powinno być ujęte w cudzysłów,
- we Wstępie i na Ryc. 2 iteronom nadano numerację wg alfabetu rzymskiego, a na Rycinie 1 oraz w pozostałych częściach pracy – wg alfabetu arabskiego,
- podczas lektury pracy po raz pierwszy spotkałem się również z terminem superimpozycja (str. 75) - czy jest on poprawny i stosowany w języku polskim?

Ponadto zauważyłem, że oznaczania niektórych rycin nie są w pełni zgodne z zamieszczonymi opisami. Na przykład na Ryc. 1 kolorem żółtym powinny być zaznaczone iterony, a w rzeczywistości są one wyróżnione kolorem zielonym (zielony kolor czcionki na zielonym tle nie jest dobrym zestawieniem); ponadto nie zaznaczono odpowiednio (na czerwono) wszystkich substytucji nukleotydowych warunkujących zmianę aminokwasów w sekwencjach białek fagów 933W i P27. Na Rycinie 14, zmiany nukleotydów w sekwencji przedstawiono na dwa sposoby - czarną czcionką na białym tle oraz białą na szarym tle. Według jakiego klucza zróżnicowano te podstawienia. Analogiczne pytanie dotyczy Ryc. 15, przedstawiającej zestawienie sekwencji aminokwasowych białek O trzech fagów. Obie ryciny zawierają wyróżnione na żółto nukleotydy bądź aminokwasy, co nie zostało wytłumaczone w opisie. Jest prawdopodobne, że niektóre z ww. anomalii kolorystycznych wynikają z problemów natury technicznej, do których doszło na etapie wydruku rozprawy. Zadaniem recenzenta nie jest jednak dociekanie tych przyczyn, lecz ocena dostarczonego egzemplarza pracy. Przy braku dostępu do jej wersji elektronicznej, czuję się w obowiązku do wskazania zauważonych niedociągnięć.

Ocena poszczególnych części rozprawy

Na początku rozprawy znajduje się, pomocny w lekturze, *Wykaz stosowanych skrótów*. Nie ujęto ich jednak wszystkich – brakuje np. skrótów DMS, EMSA, FRET (rozwińcie tego ostatniego w ogólnie nie pojawia się w pracy), a umieszczenie w tym wykazie wzorów związków chemicznych, jednostek układu SI oraz symbolu „%” uważam za niewłaściwe.

Rozdział Wstęp obejmuje 8 stron rozprawy. Zawiera on 5 równocennych w hierarchii numeracji podrozdziałów, w których opisano kolejno: (1) szczepy *Escherichia coli* produkujące toksyny Shiga, (2) rolę białka inicjatorowego O w replikacji bakteriofagów lambda i Stx, (3) kluczowe elementy regulacji inicjacji replikacji DNA faga lambda, (4) wiązanie DNA przez białko O u bakteriofaga lambda, a w ostatnim (5) zwrócono uwagę na różnice w budowie aparatu replikacyjnego bakteriofagów lambda i Stx. Ze zrozumiałych względów najwięcej uwagi poświęcono systemowi replikacyjnemu profaga lambda, którego mechanizmy regulacji inicjacji replikacji zostały dość dobrze poznane. W pracy przedstawiono je jednak skrótowo, pomijając m.in. informację o regulacyjnej roli transkrypcji zachodzącej z promotora pO na aktywację inicjacji replikacji (praca Olszewskiego i wsp. z 2014 r. z macierzystej grupy badawczej, nie cytowana w rozprawie). Na pewno dobrym rozwiązaniem byłoby umieszczenie we Wstępie ryciny przedstawiającej schematycznie strukturę systemu replikacyjnego profaga Lambda z uwzględnieniem wszystkich poznanych dotąd mechanizmów regulacyjnych. Mimo wspomnianych uwag, należy podkreślić, że rozdział ten zawiera podstawowe informacje

niezbędne do zrozumienia istoty problemu badawczego oraz oceny zasadności postawionego w rozprawie celu naukowego.

W kolejnych dwóch rozdziałach pracy przedstawiono wykorzystane w badaniach materiały i metody. Doktorantka zawarła w nich informacje istotne dla powtórzenia najważniejszych eksperymentów. Moje uwagi krytyczne dotyczą m.in. (a) zbyt lakonicznej charakterystyki plazmidów wykorzystanych w pracy (np. w przypadku wektora pET24 nie wspomniano jaki zawiera system ekspresji, warunkujący nadprodukcję białek) oraz (b) hierarchii niektórych podrozdziałów w części metodologicznej (np. podrozdziały 4.2. *Plazmidy do nadprodukcji białek O*, i 4.3. *Plazmidy do testów in vitro*, powinny wchodzić w skład głównego podrozdziału 4.1. *Konstrukcja plazmidów*). W rozdziale *Materiały* Doktorantka wymienia wykorzystane „programy i narzędzia multimedialne” (rozd. 3.2). Czy rzeczywiście były one multimedialne? Ponadto programy te wykorzystano do przeprowadzenia analiz bioinformatycznych, które, w mojej opinii, powinny zostać ujęte w rozdziale *Metody*.

Rozdział *Wyniki* zawiera opis logicznego ciągu eksperymentów. Pierwszym, a zarazem krytycznym etapem badań było oczyszczenie białek inicjacyjnych O fagów Lambda, P27 i 933W. Doktorantka zastosowała do tego celu złożoną procedurę, która wymagała m.in. doboru odpowiedniego systemu ekspresji sklonowanych genów, zastosowania zoptymalizowanej metody łagodnej lizy komórek bakteryjnych, a także, w końcowych etapach, chromatografii powinowactwa i filtracji żelowej. Oczyszczone białka wykorzystano do zasadniczych eksperymentów, których celem było m.in. zbadanie (1) oddziaływań białek O z kompletnym *origin* fagów Lambda i Stx oraz z poszczególnymi iteronami, a także określenie kolejności i sposobu wiązania iteronów w *origin*, (2) zdolności białek do tworzenia form oligomerycznych i wskazanie aktywnej formy białka odpowiedzialnej za interakcje z DNA, a także (3) wpływu rejonu *AT-rich* położonego w obrębie *origin* na powinowactwo białek inicjacyjnych do DNA *origin* oraz zdolności tych białek do interakcji z jednoniciowym DNA rejonu *AT-rich*.

Do realizacji tych głównych zadań Doktorantka zastosowała adekwatną i zróżnicowaną metodykę badawczą, obejmującą m.in. sieciowanie kompleksów białkowych, testy typu EMSA (przeprowadzone z wykorzystaniem różnego typu matryc DNA), a także analizy footprint i FRET. W pracy stworzono również wirtualny model *N*-końcowej domeny białka inicjacyjnego faga 933W oraz dokonano jego analizy porównawczej, co dowodzi również znajomości metod z zakresu bioinformatyki.

Rozdział *Wyniki* rozpoczyna się jednak dość nietypowo – od przedstawienia szczegółowych map genetycznych plazmidów, które skonstruowano w trakcie badań. Na pierwszych 8 stronach tego rozdziału zamieszczono w sumie 11 rycin. Niektóre z nich (nr 3-5 i 8-13) przedstawiają niemal identyczne schematy konstruktów plazmidowych, w których

inserty różnią się nieznacznie sekwencją (niekiedy są to różnice jedynie kilku nukleotydów). Przedstawiono przy tym rozbudowane mapy dla kilkudziesięciu enzymów restrykcyjnych, nieistotnych dla konstrukcji plazmidów. Zamieszczenie tych ilustracji w głównej części pracy nie było dobrą decyzją. W okrojonej i syntetycznej formie mogłyby one znaleźć miejsce w Załączniku rozprawy, i stanowić dobre odniesienie m.in. do dwóch podrozdziałów Metod (4.2. i 4.3.), w których opisano konstrukcję tych plazmidów. Ryciny te sprawiają wrażenie roboczych schematów, nie zostały one opracowane według spójnego stylu, w niektórych (nr 3-5) nie podano nazw plazmidów, a w innych przypadkach (nr 6-13) podane nazwy nie odpowiadają właściwym nazwom konstruktów, zamieszczonym w podpisach rycin.

Analizując inne ryciny tej części rozprawy, chciałbym również zwrócić uwagę na powielenie informacji zamieszczonych na rycinach nr 1 i 14 oraz 2 i 29, a także na rozbudowane opisy niektórych rycin, przedstawiających rozdział elektroforetyczny DNA i kompleksów nukleoproteinowych (np. nr 21, 22, 39), które nie ułatwiają analizy przedstawionych wyników (dobrym rozwiązaniem byłoby odpowiednie opisanie ścieżek tych żeli bezpośrednio na rycinach). Ponadto na rycinach 17BC i 19ABC wielkości markerów masy molekularnej białek powinny być zaznaczone niezależnie w każdym panelu, a nie wspólnie dla kilku różnych żeli.

Mam kilka pytań dotyczących tej części rozprawy:

- na Rycinie 22, przedstawiającej sieciowanie kompleksów białek O, bezpośrednio powyżej dimerów wyraźnie widoczne są nieopisane formy białka. Jaka jest ich szacowana wielkość i czy zostały one zdefiniowane?

- w testach EMSA, przeprowadzanych z wykorzystaniem różnych matryc DNA, kontrolę negatywną, w postaci DNA plazmidu pUC18, zastosowano jedynie w pierwszym eksperymencie, badającym specyficzność wiązania białek O do plazmidów zawierających *origin* (Ryc. 21). Nie zastosowano odpowiednich kontroli w pozostałych testach, w których badano interakcje białek z krótszymi fragmentami DNA. W pierwszym z ww. testów podano ilość stosowanego białka (250-500 ng), a w pozostałych przedstawiono jedynie proporcje białka do DNA (molarne ?). Poprosiłbym o ujednoczenie tych danych w prezentacji i krytyczną dyskusję wyników testów EMSA;

- w teście EMSA kołowej permutacji (Ryc. 39) wykorzystano pięć różnych matryc DNA. Rycina 38 sugeruje, że do badań wybrano iteron 1 (Ryc. 38), a nie iteron 2 lub 3, względem których białka inicjacyjne fagów wykazują znacznie większe powinowactwo. Rycina 39 jest mało czytelna. Czy eksperyment kołowej permutacji przeprowadzono kilkakrotnie? W ścieżkach 9 i 10 widoczne są wyraźne różnice w tempie migracji kompleksów nukleoproteinowych, chociaż

w obu znajdują się te same próby (matryca 5 + λ O), co poddaje w wątpliwość wyniki tego eksperymentu;

- zestawienie sekwencji N-końcowych części białek O na Rycinie 34 nie uwzględnia ok. 20 początkowych aminokwasów, wśród których występuje zmiana jednego aminokwasu. Dlaczego pominięto ten fragment? Czy został on również pominięty w stworzonym wirtualnym modelu N-końcowej części białek inicjacyjnych? Na rycinach obrazujących ten model brakuje wyraźnie zaznaczonej lokalizacji aminokwasów odmiennych względem sekwencji białka O Lambda.

W *Dyskusji* przeanalizowano i krytycznie omówiono kolejno wyniki wszystkich realizowanych w rozprawie zadań badawczych. Rozdział ten stanowi mocną i wartościową stronę rozprawy, a jego lektura przekonuje o dojrzałości naukowej Doktorantki i jej dogłębnej wiedzy z zakresu podjętej tematyki. Dyskusję przeprowadzono na tle odpowiednio dobranych, aktualnych pozycji bibliograficznych, których zestawienie przedstawiono w rozdziale *Literatura*. Rozprawę kończy *Podsumowanie*, którego dopełnieniem jest spójny model, stworzony w oparciu o wyniki rozprawy, przedstawiający hipotetyczne różnice w tworzeniu O-somów analizowanych w pracy fagów lamdoidalnych.

Przedstawione w mojej recenzji uwagi, głównie natury redakcyjnej i edytorskiej, nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Do najważniejszych jej osiągnięć niewątpliwie należy zaliczyć:

- opracowanie nowej, skutecznej i wydajnej metody izolacji wysoce oczyszczonych preparatów białek inicjacyjnych fagów lamdoidalnych. Należy podkreślić, że wyniki tej części rozprawy zostały już opublikowane w czasopiśmie *Protein Expression and Purification*, a Doktorantka jest pierwszym i korespondującym autorem powstałej pracy;
- określenie po raz pierwszy właściwości *in vitro* białek O fagów Stx oraz wskazanie podobieństw i różnic względem białka inicjatorowego faga Lambda;
- uzyskanie wyników wskazujących na to, iż mimo różnicy w strukturze *origin*, interakcje białek inicjatorowych fagów Lambda i Stx z iteronami *origin* przebiegają podobnie. Dodatkowe iterony Stx są marginalizowane podczas inicjacji replikacji, co sugeruje, iż zasadniczą korzyścią płynącą z ich występowania może być zmiana sekwencji aminokwasowych białek inicjatorowych, rzutująca na właściwości tych białek oraz strukturę tworzonego przez nie O-somu;

- przedstawienie wstępnego modelu tworzenia kompleksów nukleoproteinowych w obrębie *origin Stx*.

W mojej opinii, praca ta stanowi wartościowe opracowanie, a jej wyniki wnoszą nowe treści do ogólnej wiedzy na temat regulacji procesu inicjacji replikacji grupy fagów Stx. Pozwalają one lepiej zrozumieć przebieg podstawowego procesu kontrolującego rozwój tych fagów, co, ze względu na patogenny charakter niosących je szczepów EHEC, nabiera szczególnego znaczenia.

Podsumowując, badania przedstawione w recenzowanej rozprawie są nowatorskie, wykonane z zastosowaniem odpowiednio dobranych metod, a sama rozprawa stanowi spójną merytorycznie całość. Rozprawa przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i dowodzi ogólnej wiedzy Doktorantki w zakresie biologii molekularnej fagów. W mojej opinii praca ta spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim, dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik

