



Gdańsk, 5.05.2019

dr hab. Gracjana Klein-Raina  
Pracownia Genetyki Bakterii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska  
ul. G. Narutowicza 11/12  
80-233 Gdańsk

#### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana mgr Macieja Dylewskiego  
pt. „Rola małego RNA – GraL, w regulacji ekspresji genów *Escherichia coli*”**

Rozprawa doktorska Pana mgr Macieja Dylewskiego została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Promotor Pani dr hab. Katarzyny Potrykus, prof. UG. Przewód prowadzony jest w dziedzinie Nauki Biologiczne, w dyscyplinie Biologia. Temat pracy doktorskiej obejmuje zbadanie i wyjaśnienie roli małego RNA GraL, zarówno *in cis* jak i *in trans*, w regulacji ekspresji genów modelowej bakterii *Escherichia coli*, znalezienie celów molekularnych powyższego sRNA, a także badanie jego wpływu na autoregulację ekspresji genu *greA*.

Większość bakterii koduje bogactwo mechanizmów regulacyjnych opartych na RNA. Niedawne odkrycia ujawniły, że ekspresja wielu genów jest kontrolowana przez mnóstwo parujących zasady, niekodujących, małych, regulatorowych RNA (sRNA), przez regulatorowe białka wiążące RNA oraz przez enzymy degradujące RNA. Niektóre z tych opartych na RNA procesów regulatorowych odpowiedzialne są za wyczuwanie warunków stresowych i uczestniczą w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Niekodujące RNA, które regulują

GUR

ekspresję genów przez wiązanie się z białkami regulatorowymi lub czynnikami biorącymi udział w procesie transkrypcji, często działają negatywnie poprzez sekwestrację, co zapobiega rozpoznaniu celu molekularnego. Ekspresja wielu sRNA jest pozytywnie regulowana przez reagujące na stres czynniki sigma, takie jak RpoE i RpoS, oraz systemy dwuskładnikowe PhoP/Q, Cpx i Rcs. Niektóre z tych regulacyjnych RNA działają poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Parujący zasady sRNA, w zależności od lokalizacji genomowej i od docelowego mRNA, może działać *in cis* lub *in trans*. Wiele z sRNA funkcjonuje poprzez niedoskonałe parowanie zasad z wieloma docelowymi mRNA i często wymaga pomocy chaperonów RNA Hfq i ProQ.

Szeroko zakrojone badania, obejmujące analizę RNA-seq, RIL-seq, CLASH oraz immunoprecypitację z chaperonami RNA, powiększyły repertuar sRNA i ich celów molekularnych. W ten sposób wykazano, że sRNA mogą pochodzić z różnych rejonów genomowych: mogą być antysensowne do kodujących regionów, mogą być z 3'UTR, z 5'UTR, a nawet mogą pochodzić z rejonów kodujących.

sRNA są wszechobecne i wpływają na każdy aspekt fizjologii bakterii. Nowe, zaawansowane technologie biologii molekularnej pozwoliły na zidentyfikowanie wielu nowych sRNA i ich celów. Wyzwaniem nadal pozostaje integracja wszystkich sRNA i ich celów w skomplikowane systemy regulacyjne i procesy życiowe komórki bakteryjnej. Praca doktorska mgr Macieja Dylewskiego wpisuje się w nurt takich kompleksowych studiów, koncentrując się na poszukiwaniu roli sRNA GraL w regulacji ekspresji genów u bakterii *E. coli*.

GraL jest kodowany w regionie liderowym genu *greA* i powstaje w wyniku wcześniejszej terminacji mRNA *greA*. GreA jest czynnikiem transkrypcyjnym zwiększającym wierność syntezy RNA i zapobiegającym zatrzymywaniu się kompleksu elongacyjnego polimerazy RNA. Bardzo ciekawa jest autoregulacja genu *greA* – nadprodukcja białka GreA *in trans* powoduje zmniejszenie ekspresji genu *greA*. Tymi zagadnieniami z sukcesem zajmuje się zespół dr hab. Katarzyny Potrykus, a badania Doktoranta mgr Macieja Dylewskiego stanowią ważny i logiczny etap ich kontynuacji. Stąd wybór tematu rozprawy doktorskiej jest trafny i aktualny.

Praca doktorska ma postać obszernej monografii, opracowanej bardzo starannie i zgodnie z formalnymi wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Rozprawa doktorska ma klasyczny układ, a proporcje jej poszczególnych rozdziałów są odpowiednio wyważone.

Mgr Maciej Dylewski podjął się bardzo ambitnego i ciekawego celu. Sformułował go zwięźle i precyzyjnie, dodatkowo określając zakres pracy, obejmujący m.in. konstrukcje fuzji genowych potencjalnych celów molekularnych badanego sRNA, wytypowanie celów molekularnych, zbadanie oddziaływań sRNA z docelowymi mRNA, analizę funkcji elementów sekwencji niekodującej, określenie roli sRNA w autoregulacji genu *greA* oraz poznanie roli innych czynników w tym procesie, a także identyfikację genów, których delecja powoduje zmiany w ekspresji genu *greA*, poprzez konstrukcje bibliotek genomowych zawierających losowe insercje transpozonu.

Wstęp jest ściśle związany z celem pracy i stanowi dogłębne kompendium wiedzy na temat sRNA. W sposób usystematyzowany i wyczerpujący Doktorant omawia w nim poszczególne aspekty małych RNA poczynając od ich ogólnej charakterystyki, poprzez pochodzenie i ewolucję, opis sRNA działających *in trans*, następnie *in cis*, wskazuje na różnorodność sRNA oraz ich wielorakie funkcje w komórce. Następnie płynnie przechodzi do sRNA GraL i charakterystyki białka GreA, w tym jego roli w procesie transkrypcji. Ten zwięzły przegląd i podsumowanie stanu wiedzy na temat sRNA stanowi niezwykle rzeczowe wprowadzenie do zaplanowanych badań i uzasadnia ich celowość. Tak bardzo dobre opracowanie wstępu pod względem merytorycznym wskazuje na gruntowną wiedzę Doktoranta i na jego wzorowe przygotowanie teoretyczne do realizacji celów badań.

Do osiągnięcia postawionego celu pracy doktorskiej konieczne było zastosowanie badań *in vitro* i *in vivo* oraz wielu technik biologii molekularnej. Dobór metod badawczych jest właściwy i dobrze odpowiada potrzebom realizacji celów zdefiniowanych przez Doktoranta. Postępowanie doświadczalne zaplanowano poprawnie i przedstawiono w sposób zrozumiały. Autor w sposób niezwykle biegły posługuje się wieloma technikami i dysponuje bogatym warsztatem badawczym. Świadczy to znakomitym przygotowaniem metodycznym doktoranta. Na szczególną uwagę zasługuje logiczne wytlumaczenie i uzasadnienie podjęcia kolejnych etapów w badaniach. Doktorant dokładnie i wyczerpująco opisał użyte szczepy bakteryjne, plazmidy, oligonukleotydy oraz sekwencje fuzji reporterowych (w Suplemencie), a także procedury eksperymentalne zastosowane w pracy doświadczalnej.

Realizacja części eksperymentalnej była bardzo pracochłonna i czasochłonna, ale dzięki temu widać ogrom włożonej pracy i systematyczność mgr Macieja Dylewskiego. Eksperymenty zostały starannie przeprowadzone. Na podkreślenie zasługuje kompleksowość i szeroki zakres

wykonanych badań. Imponująca ilość wyników została przedstawiona w przejrzystości opracowanych rysunkach, schematach, tabelach i wykresach. Opis wyników jest przygotowany bardzo starannie i szczegółowo. Autor wnikliwie i rzeczowo przedyskutował wyniki kolejnych doświadczeń, odnosząc je w miarę możliwości do danych literaturowych. Wnioski płynące z wykonanych badań są prawidłowe. Każdy rozdział wyników kończy się krótkim, syntetycznym podsumowaniem, co ułatwia lekturę dysertacji.

Na podkreślenie zasługuje umiejętność rzeczowego uogólnienia tak dużej ilości wyników. Wykazano m. in. że: najbardziej prawdopodobnym celem molekularnym sRNA GraL *in trans* jest mRNA *nudE*, GraL wiąże się z Hfq *in vitro* i łatwo jest usuwany z kompleksów przez mRNA *nudE*, *in cis* sekwencja badanego sRNA jest konieczna i wystarczająca do autoregulacji genu *greA*, a ekspresja genu *greA* jest zakłócana przez zmiany w ekspresji genów związanych z syntezą białek błonowych, odpowiedzią na stres pozacytoplazmatyczny oraz metabolizmem NAD.

W części Dyskusja najlepiej widać dojrzałość naukową i kompletność warsztatu badawczego Doktoranta, który bardzo dobrze omawia uzyskane wyniki oraz prowadzi dogłębną i wyczerpującą dyskusję. Ponadto Autor konfrontuje uzyskane rezultaty z danymi z literatury. Pracę kończy siedem dobrze wyodrębnionych, kluczowych wniosków, logicznie wynikających z przeprowadzonych badań. Ich szczegółowa interpretacja nie budzi zastrzeżeń.

Bogaty spis literatury obejmuje 177 pozycji w tym klasyczne publikacje o regulatorowych RNA, jak i te najnowsze, także z 2019 roku. Są one dobrze dobrane i właściwie zacytowane. Wybór literatury świadczy o gruntownym przestudiowaniu przez autora zagadnień związanych z tematem dysertacji. Mgr Maciej Dylewski zebrał piśmiennictwo z dużą skrupulatnością i krytycyzmem, co sprawia, iż obiektywnie odzwierciedla ono aktualny stan wiedzy na temat małych RNA. W tekście pracy Doktorant wiele razy cytuje publikację swego Promotora: Potrykus i inni z 2010 roku, jednakże w spisie literatury błędnie podał przy niej rok 2009.

Rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem naukowym i starannie zredagowana. Ilość błędów redakcyjnych jest znikoma, a potknięcia stylistyczne, gramatyczne i interpunkcyjne, a także drobne nieścisłości merytoryczne oraz nomenklaturowe są nieliczne. I tak np.:

str. 15<sup>43</sup> w nazwie bakterii *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, słowo Typhimurium powinno być pisane z dużej litery, a całe słowo nie kursywą,

str. 20<sup>36</sup> powinno być OmrA/OmrB,

Str. 24<sup>4-5</sup> gen *hfq* nie jest chaperonem, lecz koduje chaperon Hfq,

Str. 87 w opisie pod Rys. 23 jest pKontrola, na rysunku jest pWektor,

Str. 104<sup>1</sup> powinien być symbol  $\sigma^E$  zamiast  $\delta^E$ ,

Str. 108<sup>47</sup> Doktorant zalicza wirusy do organizmów. Ponieważ ciągle toczy się debata na temat tego, czy wirusy to organizmy, czy nie, bardziej ostrożnie należałoby formułować stwierdzenie zaliczające je do organizmów.

Powyższe drobne uchybienia nie wpływają jednak na bardzo wysoką ocenę pracy.

Podczas lektury rozprawy doktorskiej mgr Macieja Dylewskiego nasunęły mi się następujące pytania:

1. W rozdziale Wyniki podrozdział 5.3.3. Rola  $\sigma^E$  (strony 103-105) pokazano, że nadprodukcja źle sfałdowanego peptydu YYF z plazmidu pBAI66 spowodowała tylko niewielki wzrost aktywności  $E\sigma^E$ -regulowanego promotora P2. Czy Doktorant przetestował aktywność promotora P2 także w innych warunkach, które indukują ekspresję genu *rpoE*, takich jak: (a) nieobecność czynnika anty-sigma RseA, którego to brak indukuje aktywność  $\sigma^E$  nawet 10-krotnie, (b) uszkodzenia LPS, które również znacząco indukują RpoE?
2. Pytanie dotyczące poszukiwania czynników regulujących ekspresję genu *greA/GraL*, z wykorzystaniem szczepów niosących fuzje promotorowe i bibliotek genomowych z losowymi insercjami transpozonu (Wyniki str. 105, Tabele 32 i 33 str. 106, Dyskusja strony 112-114). Jak słusznie Autor zauważył, niektóre ze zidentyfikowanych genów działają poprzez indukcję podjednostki sigma RpoE, np. niektóre z genów biosyntezy LPS (*waaG/waaP*). Jeśli system regulacyjny rzeczywiście jest  $\sigma^E$ -zależny, w zastosowanej mutagenезie powinno się również uzyskać insercje transpozonu w genach takich jak *rseA*, *surA*, *waaC*, które w sposób maksymalny indukują  $\sigma^E$ . Pytanie czy mutagenезa była nasycona? A może warunki mutagenезy można by stosownie zmienić? Oczywiście mutagenезa z użyciem transpozonu nie może zidentyfikować genów, które są konieczne do życia. Alternatywnie zastosowanie wielokopijnej ekspresji genów może być dodatkową strategią.

Podsumowując, tematyka recenzowanej pracy jest ciekawa, ważna i wkomponowana w światowy nurt badań nad sRNA. Przedstawiony przez Autora cel został osiągnięty: uzyskane wyniki pomagają zrozumieć funkcje sRNA GraL, jak również wskazują na nowe elementy

zaangażowane w regulację ekspresji genu *greA*. Wartością podjętych badań jest ich kompleksowość. Szeroki zakres badań jest imponujący. Zostały one dobrze zaplanowane oraz poprawnie wykonane, co wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia złożonych prac eksperymentalnych przez Doktoranta. Uzyskane wyniki są dobrze udokumentowane, a ich opis oraz interpretacja zrozumiała i wyczerpująca. Rozprawę oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim. Szata graficzna jest czytelna i sporządzona starannie. Praca doktorska mgr Macieja Dylewskiego zawiera dużą ilość wartościowych i cennych wyników znacząco rozszerzających naszą wiedzę o małych regulatorowych RNA.

Należy podkreślić, że praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2013/09/B/NZ1/01066 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Macieja Dylewskiego pt. „Rola małego RNA – GraL, w regulacji ekspresji genów *Escherichia coli*” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnieniem jest wysokie znaczenie wybranego problemu badawczego oraz uzyskane przez Doktoranta oryginalne, nowatorskie wyniki badań.

Gracjan Mier-Rajna