

wpz. 21.08.2020

Dr hab. Krzysztof Waleron
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny GUMed
krzysztof.waleron@gumed.edu.pl

Gdańsk 20.08.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wilkowskiej zatytułowanej „Wpływ poziomu ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI na efektywność restrykcji inwazyjnego DNA”, wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Mariana Sęktasa profesora UG od wielu lat specjalizującego się w badaniach molekularnych dotyczących różnych aspektów funkcjonowania, specyficzności, ewolucji i dystrybucji bakteryjnych systemów restrykcyjno- modyfikacyjnych.

Bakteryjne systemy restrykcyjno-modyfikacyjne od dziesięcioleci intrygują naukowców. Zjawisko restrykcji po raz pierwszy opisano w latach 50-tych, kiedy zaobserwowano, że wyhodowany na jednym szczepie bakteriofag nie zawsze zdolny jest infekować inne szczepy tego samego gatunku bakterii. Wyjaśnienie tego procesu i opisanie enzymów, endonukleazy oraz związanej z nią metylotransferazy uruchomiło całą kaskadę interesujących eksperymentów i związanych z nimi odkryć. Opisano nowe specyficzności tej grupy enzymów, rozpowszechnienie w naturze oraz ich znaczenie w kontroli nad procesami horyzontalnego transferu genów czy stabilności genomów organizmów prokariotycznych. Bakteriofagi wydają się być nieodłącznym elementem tego złożonego układu. Systemy restrykcji i modyfikacji mimo znaczącej bioróżnorodności cechującej się różnicami w charakterystyce rozpoznawanych sekwencji, charakterystyce miejsca cięcia nici DNA, przebiegu reakcji cięcia czy modyfikacji DNA, różnorodności mechanizmów kontrolujących ekspresję tych białek pełnią, jednakże stabilną funkcję. Endonukleaza rozpoznaje specyficzne motywy nukleotydów na nici DNA i przecina w ich obrębie lub poza nimi. Metyltransferaza niejako służy do wyznakowania specyficznie DNA genomowego gospodarza. Enzym ten modyfikuje rozpoznawane przez endonukleazę sekwencje poprzez dołączenie grupy metylowej do określonych nukleotydów co sprawia, że w efekcie genom gospodarza jest chroniony przed restrykcją. Endonukleazy restrykcyjne wprowadzone na rynek jako jedne z pierwszych produktów nowoczesnej biotechnologii stały się nieodłącznym narzędziem badawczym znacząco wpływając na postęp wielu kierunków badań, bez ich powszechnej dostępności recenzowana praca nie miałaby szansy powodzenia.

Autorka przedłożonej do oceny rozprawy podjęła się interesującego wyzwania mającego na celu wyjaśnienie, nie badanego dotąd zagadnienia, jaki wpływ mają zmiany poziomu ekspresji i biosyntezy białek endonukleazy restrykcyjnej i metylotransferazy, na efektywną ochronę komórki przed DNA zewnątrzkomórkowym oraz ochronę integralności genomu a także na stabilne utrzymanie się systemu R-M w komórce bakteryjnej. Planowane doświadczenia miały również prowadzić do określenia optymalnej dla funkcjonowania komórki relacji pomiędzy poziomami biosyntezy obydwu enzymów.

Badania doktorantki objęły zasługujący na uznanie bardzo szeroki zakres eksperymentów, z których wyniki doprowadziły do interesujących konkluzji końcowych.

Modelowym systemem R-M wybranym do tego projektu był EcoRI pochodzący z *Escherichia coli* i rozpoznający sześci nukleotydową sekwencję palindromiczną G^AAATTC. Oryginalnie wyizolowany system umiejscowiony był na plazmidzie pMB1, spokrewnionym z plazmidami grupy ColE1. Występowanie systemu R-M naturalnie zlokalizowanego na plazmidzie nie jest zjawiskiem powszechnym w świecie mikroorganizmów, znacząca większość tego typu enzymów występuje na chromosomie. Ale plazmidowa lokalizacja daje bardzo wygodny model badawczy pozwalający na wielowariantowe analizy.

W oparciu o ten modelowy system doktorantka postawiła za cel wyjaśnienie mechanizmów kilku procesów.

- Określenie wpływu bakteriofagowych elementów genetycznych na efektywność restrykcji fagowego DNA.
- Zbadanie wpływu obecności systemu rekombinacji miejscowo specyficznej Xer/cer na ekspresję genów systemu R-M.
- Przeprowadzenie mutagenезы prowadzącej do wymiany konserwatywnych elementów głównego promotora systemu EroRI P_R w celu zbadania potencjału tego promotora na efektywność ekspresji genów R-M.
- Określenie wpływu na ekspresję dodatkowych sygnałów transkrypcyjnych spoza operonu R-M.
- Badania indukcji odpowiedzi SOS na skutek zmian poziomu ekspresji endonukleazy i metylotransferazy.

Podjęte badania są pracochłonne wymagają dobrze opanowanego warsztatu inżynierii genetycznej i biegłości w pracy z bakteriami i izolowanymi z nich białkami co zasługuje na szczególne podkreślenie. Charakter podjętych badań można uznać za nowatorski, ponieważ dotychczas opisane prace nad regulacją ekspresji systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych skupiały się na mechanizmach tworzonych przez elementy genetyczne pochodzące z danego systemu R-M, bez uwzględnienia możliwości oddziaływania sygnałów transkrypcyjnych i aktywności z otoczenia systemu-M. Doktorantka wypracowała też całą pulę układów badawczych, które mogą inspirować do dalszych eksperymentów.

Rozprawa liczy 170 stron i ma typowy układ dla publikacji naukowych podzielonych na wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wykaz wykorzystanej literatury oraz suplement. Wstęp pracy zilustrowano a część eksperymentalną udokumentowano łącznie 47 rycinami i 8 tabelami.

Wstęp obejmuje 33 strony i został podzielony na 7 rozdziałów. Pierwszy obejmuje omówienie systemów restrykcji i modyfikacji jako elementu oporności komórki na inwazyjne DNA na tle innych systemów ochrony stabilności genomu bakteryjnego takich jak, systemy abortywnej infekcji, systemy CRISPR/CAS, glikozylacji restrykcyjnej czy maskowania receptorów fagowych na powierzchni komórki. Brakuje mi w tym miejscu jeszcze jednego bardzo ciekawego systemu obrony komórek przed bakteriofagami opartego o pęcherzyki zewnątrz błonowe wydzielane przez komórki bakteryjne do środowiska. Prosiłbym w tym miejscu autorkę o komentarz czy ten pominięty mechanizm może mieć znaczenie dla interpretacji niektórych wyników jej badań?

Kolejny rozdział omawia mechanizmy antyrestrykcyjne jakie wyewoluowały na skutek interakcji bakteriofagów z bakteriami posiadającymi systemy R-M. W dalszych częściach autorka omawia

funkcje systemów R-M jakie pełnią w komórce, współczesne zasady klasyfikacji tej grupy białek. W kolejnym rozdziale omawia kluczowe z punktu widzenia pracy mechanizmy regulacji ekspresji systemów RM następnie koncentruje się na zreferowaniu aktualnego stanu wiedzy na temat modelowego dla jej badań systemu R-M EcoRI i organizacji jego determinant genetycznych a na koniec poświęca uwagę systemowi rekombinacji miejscowo specyficznej Xer/cer, który jest zlokalizowany w rejonie promotorowym naturalnego systemu R-M EcoRI i może mieć znaczenie dla planowanych eksperymentów.

Kolejne rozdziały Materiały i Metody obejmują wykaz wykorzystanych szczepów bakteryjnych, bakteriofagów oraz plazmidów, enzymów, antybiotyków, oligonukleotydów potrzebnych do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń. Metodyka została opracowana szczegółowo. autorka na potrzeby badań, dla odzwierciedlenia różnych układów genetycznych, skonstruowała i wykorzystała 30 plazmidów. Opisana metodyka świadczy również o korzystaniu z wielu różnych technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwalających na weryfikację obserwowanych wyników i wiarygodną dokumentację dowodów potwierdzających obserwowane zjawiska.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy dobrze dokumentowany wysokiej jakości ilustracjami z kolejnych eksperymentów.

W pierwszym podjętym zadaniu mającym na celu określenie wpływu bakteriofagowych elementów genetycznych na efektywność restrykcji fagowego DNA Doktorantka wykorzystała dwa konstrukty plazmidowe, pACYCeco zapewniający wysoką efektywność restrykcji oraz pIM-RM generujący niski poziom restrykcji mimo, iż w obu przypadkach sekwencje genów były identyczne. Jedną z różnic było usytuowanie systemu R-M względem genu acetylotransferazy chloramfenikolowej *cat*, różnicę stanowiła też obecność bądź brak promotora P_{L1} i sekwencji antyterminatorowej *nutL* pochodzących od bakteriofaga Lambda. Ta część eksperymentów wykazała, że elementy genetyczne w otoczeniu systemu R-M mogą mieć znaczenie w regulacji ekspresji, jak obecność promotora acetylotransferazy chloramfenikolowej, którego usunięcie podwyższa wydajność restrykcji, co więcej wstawie silnego promotora arabinozowego przed operonem EcoRI prowadziło do stopniowego obniżania efektywności restrykcji bakteriofaga Lambda stosownie do wzrastającego stężenia induktora. Natomiast dodatkowe elementy genetyczne szczątkowy promotor P_{L1} i sekwencja antyterminatorowa *nutL* mają niewielki wpływ na ekspresję genów R-M a co za tym idzie wydajność restrykcji. W kolejnym kroku Doktorantka udowodniła, że obecność systemu rekombinacji miejscowo specyficznej Xer/cer nie ma wpływu na regulację ekspresji operonu R-M EcoRI.

W dalszej części pracy Autorka skoncentrowała się na potencjale głównego promotora systemu EcoRI P_R z którego powstaje bicistronowy mRNA dla obu genów endonukleazy i metylotransferazy. Chcąc odpowiedzieć na pytanie, które elementy promotora są odpowiedzialne za utrzymanie optymalnego poziomu ekspresji systemu EcoRI, co jest warunkiem koniecznym do efektywnej restrykcji inwazyjnego DNA. Do wyjaśnienia tego zagadnienia doktorantka wykorzystała mutagenezę miejscowo specyficzną otrzymując szereg konstruktów ze zmianami w rejonie promotorowym wykorzystała 6 różnych konstruktów. Ta część doświadczeń doprowadziła do konkluzji, że promotor P_R jest optymalny i zapewnia właściwą ekspresję systemu EcoRI a każda ingerencja w postaci wymiany promotora na inny, usunięcie podjednostki -35 skutkuje drastycznym podwyższeniem biosyntezy białek systemu RM lub też jej obniżeniem. Podobnie wymiana fragmentu rejonu RBS przyczynia się do osłabienia restrykcji.

Wykonane doświadczenia doprowadziły do konstrukcji 13 plazmidów umożliwiających:

1. wysoką ekspresję systemu EcoRI co skutkowało słabą efektywnością restrykcji DNA,
2. optymalną ekspresję systemu EcoRI pozwalającą na efektywną restrykcję DNA,
3. niską ekspresję systemu EcoRI gdzie restrykcja DNA była nieskuteczna,
4. plazmidów z niewykrywalną ekspresją systemu R-M również skutkującą brakiem restrykcji DNA.

Dosyć trudnym wyzwaniem z jakim zmierzyła się doktorantka było badanie poziomu transkrypcji operonu R-M EcoRI w różnych układach. Do tego celu wykorzystwała fuzję translacyjną z genem reporterowym *lacZ*. Trudność stanowił fakt, że inaktywacja genu metylotransferazy czyni plazmid nietransformowalnym i trzeba się posilkować wprowadzeniem mutacji do genu endonukleazy aby unieczynnić również aktywność restrykcyjną - toksyczną dla nie chronionej metylacją komórki. Do badania relatywnego poziomu mRNA w badanych układach genów Autorka posłużyła się techniką RT-qPCR.

Ta część doświadczeń doprowadziła do wniosku, że poziom ekspresji systemu R-M EcoRI jest stabilny i niezależny od fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. W plazmidzie pIM-RM o wysokiej ekspresji R-M, ekspresja endonukleazy odbywa się na 14 krotnie wyższym poziomie w stosunku do plazmidu o niskiej ekspresji pACYCeco a w przypadku genu metylotransferazy różnica ta wynosi 10 krotność. Zjawisko to skutkuje 6 krotnie podwyższonym poziomem biosyntezy białek R-M w przypadku plazmidu pIM-RM.

Ostatnia część eksperymentów obejmowała badania wpływu wysokiej i niskiej ekspresji systemu R-M EcoRI, w tym różnych poziomów biosyntezy endonukleazy EcoRI, na żywotność komórek i indukcję odpowiedzi SOS. Obserwacje obejmowały zmiany morfologii komórek - filamentację oraz pomiary fluorescencji jako wskaźnika odpowiedzi komórkowej.

Doktorantka wykazała, że wysoki poziom biosyntezy endonukleazy restrykcyjnej przyczynia się do autorestrykcji i indukcji odpowiedzi komórkowej SOS obserwowanej jako pojawienie się filamentów komórek i fluorescencję na skutek ekspresji genu reporterowego *gfp*. Wprowadzenie nadprodukcji metylotransferazy znosi efekt autorestrykcji DNA uwidoczniły osłabieniem zjawiska filamentacji i spadkiem poziomu fluorescencji co ciekawe w tym przypadku obserwowano również spadek efektywności restrykcji faga lambda wskutek modyfikacji DNA bakteriofagowego.

Podobne zjawisko obniżenia poziomu ekspresji genów systemu EcoRI a za tym wzrost wydajności restrykcji inwazyjnego DNA doktorantka zaobserwowała dzięki modyfikacji prowadzącej do obniżenia liczby kopii plazmidu pIM-RM w komórce *E. coli*.

Nadmierna ekspresja endonukleazy restrykcyjnej zawsze prowadzi do uruchomienia selekcji eliminującej obecność nadprodukowanego toksycznego dla komórki enzymu.

Tu w konkluzji nasuwa się interesujący problem warty zbadania i prosiłbym doktorantkę o komentarz

Badania prowadzone w tej pracy imitowały egzystencję bakterii w określonym układzie - przewodzie pokarmowym człowieka czy zwierzęcia bardzo interesujące byłoby zweryfikowanie jak opisane w

pracy zjawiska przebiegałyby w warunkach egzystencji bakterii w ekosystemie wodnym jak np. rzeka Wisła do której ostatnio bakterie wydostały się z systemu oczyszczania ścieków i gdzie panują zupełnie inne warunki. Czy niższa temperatura i dodatkowe czynniki stresowe mogą mieć jakiś wpływ na efektywność restrykcji?

Jest jeszcze jeden interesujący aspekt warty przedyskutowania, badany system restrykcyjno-modyfikacyjny nie należy w mojej opinii to tzw. pierwszoliniowych, prawdopodobnie dlatego jest wygodnym modelem badawczym. Znacznie efektywniejsze w restrykcji są systemy rozpoznające krótsze sekwencje nukleotydowe jak MboI (sekwencja rozpoznawana GATC) i jego izoschizomery ich statystyczna częstotliwość cięcia genomu *E.coli* jest co 3000 nukleotydów a bakteriofaga lambda co 400 nukleotydów (116 miejsc restrykcyjnych versus EcoRI tylko 5) jeśli porównamy częstotliwość występowania tych systemów R-M w naturze to jest niemal dziesięciokrotnie większa na rzecz MboI i to grupa systemów rozpoznających czteronukleotydowe sekwencje stanowi z pewnością pierwszą linię obrony przed obcym DNA w komórce. Prosiłbym doktorantkę o komentarz.

Dyskusja wyników podsumowuje i scala wszystkie wątki pracy. Ta część pracy została przeprowadzona w tle bogatego zestawu literatury. Załączony w rozdziale Literatura wykaz cytowanych prac obejmuje 224 pozycje dobrze dobrane i aktualne dla tematyki badawczej.

Odnosząc się do edycyjnej strony pracy napotkałem sporo pomyłek literowych i drobne potknięcia edycyjne bądź językowe, z obowiązku recenzenta przytaczam kilka przykładów: str. 11 „pęknięcia DNA, niemogące zostać naprawione” chyba lepiej brzmi (które nie mogą być), str. 15 „wykryte u plazmidów koniugacyjnych” (w plazmidach), str. 15 „istnienie wyścigu zbrojeń między bakteriofagami a bakteriami” (to niepotrzebna personalizacja ten wyścig to po prostu ewolucja napędzana presją selekcyjną) str. 36 „30 nukleotydowa sekwencja zawiera dwa **boxy** 11 nukleotydowe” (zdecydowanie lepiej określić ten element jako motywy), str. 90 „poziom restrykcji w tym przypadku był ona 6-krotnie niższy od fenotypu pIM-RM”, str. 113 „operon EcoRI zlokalizowany na plazmidzie pIM-RM kilkakrotnie zapewnia wyższy poziom produkcji endonukleazy ...”, str. 116 „delecja silnego promotora na słabsze, alternatywne promotory”, str.121 „hodowla bakteryjna *E. coli* ER1992 z której co 10 min pobierano osady” (chodzi o komórki bakterii).

Moją uwagę przykuło powszechne użycie wyrazu **produkcja** w odniesieniu do białek enzymatycznych według słownika języka polskiego produkcja wiąże się z działalnością przemysłową człowieka. Bardziej pasujący i opisujący proces biologiczny byłby wyraz biosynteza.

Uwagi te nie rzutują na moją pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy.

Przeprowadzone i opisane doświadczenia niewątpliwie wnoszą nowe informacje do ogólnej wiedzy na temat złożoności mechanizmów wpływających na efektywność restrykcji przed obcym DNA znacząco też rozbudowują potencjał modelu badawczego.

Należy też podkreślić, że pani mgr Karolina Wilkowska jest pierwszym autorem pracy zawierającej wyniki jej badań w czasopiśmie DNA Research (dostęp open access od 9 marca 2020) zaliczanym do pierwszego (najwyższego) kwartyła tzw. Q1 jeśli rozpatrujemy pozycję rankingową czasopisma, a wyniki cząstkowe zostały opublikowane w czasopiśmie Acta Biochemica Polonica Vol. 66, No 1/2019 83–89.

Podsumowując należy stwierdzić, że doktorantka w interesujący sposób i wyczerpująco przeanalizowała różne mechanizmy wpływające na zjawisko restrykcji DNA w komórce na modelowym systemie R-M EcoRI wyprowadzając właściwe wnioski. Było to duże wyzwanie wymagające pracowitych doświadczeń co zasługuje na szacunek i dostrzeżenie. Oczywiście badania te możliwe były przy wsparciu doświadczonego mentora, jednocześnie widać w tej pracy nutę pasji naukowej i to jest bardzo cenne.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską oceniam bardzo wysoko, dysertacja spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 27 września 2017 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r., poz. 1789) a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie jej stopnia doktora nauk biologicznych. Wnoszę więc do rady Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani magister Karoliny Wilkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

