



**UNIwersYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl



Warszawa, 21.08.2020

Dr hab. Monika Radlińska
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. KAROLINY WILKOWSKIEJ pt. „Wpływ poziomu ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI na efektywność restrykcji inwazyjnego DNA”

Rozprawa doktorska Pani Karoliny Wilkowskiej wykonana pod kierunkiem dr. hab. Mariana Sęktasa, prof. UG w Katedrze Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku została przygotowana zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim. Ma układ typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym. Rozprawa doktorska liczy 170 stron i zawiera 47 rycin oraz 8 tabel. Składa się na nią 11 rozdziałów, w tym Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Suplement oraz Literatura. Tekst pracy poprzedzony jest Spisem treści, Wykazem zastosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim, jak również angielskim. Bibliografia obejmuje 224 pozycje literaturowe. Pod względem swojej konstrukcji rozprawa jest jak najbardziej poprawna. Na podkreślenie zasługuje fakt niezwykle starannego wykonania rysunków.

Tytuł pracy „Wpływ poziomu ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI na efektywność restrykcji inwazyjnego DNA” odpowiada treści pracy i jest jednocześnie podany jako Cel pracy. Uznaję go za jasno określony.

Wstęp pracy liczy 34 strony, składa się z 7 podrozdziałów, w których Autorka wprowadza w tematykę pracy doktorskiej przedstawiając kolejno zagadnienia związane z: (i) różnymi bakteryjnymi strategiami obronnymi przed obcym (nazywanym w pracy inwazyjnym) DNA, (ii) fagowymi mechanizmami przeciwdziałającymi zniszczeniu ich DNA przez systemy restrykcyjne, (iii) budową i postulowaną funkcją systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych, (iv) regulacją systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II oraz (v) aktualnym stanem wiedzy o systemie restrykcyjno-modyfikacyjnym EcoRI i o systemie rekombinacji miejscowo-specyficznej Xer/ce, który towarzyszy mu na poza chromosomowym elemencie (plazmidzie). Ułożenie poszczególnych zagadnień jest klasyczne

„od ogółu do szczegółu” i jest w tym wypadku jak najbardziej poprawne, gdyż stopniowo wprowadza czytelnika w omawianą tematykę.

Ponieważ we Wstępie Pani Wilkowska przytoczyła kilka, w mojej opinii, dość śmiałych tez, chciałabym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

1. Dlaczego wysoka specyficzność rozpoznawanej sekwencji DNA przez endonukleazy restrykcyjne jest zaskakująca? Jak, zdaniem Doktorantki, komórka uniknęłaby (przetrwałaby) działania endonukleazy, która nie byłaby wysoce specyficzna?

2. Przed jakimi mechanizmami obronnymi, przypominającymi w działaniu systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M), uciekałyby (chroniłyby się) bakteriofagi RNA w świecie przed DNA?

3. Doktorantka napisała: „Niektóre z endonukleaz potrafią przecinać heterodupleks DNA i RNA, co wskazuje na wytworzenie strategii obronnej bakterii przed bakteriofagami, w których DNA znajduje się uracyl, zamiast tyminy.” Jaki jest związek przyczynowo – skutkowy między faktem, że niektóre endonukleazy restrykcyjne przecinają heterodupleks DNA i RNA, a tym, że niektóre (współczesne) fagi mają w DNA uracyl zamiast tyminy oraz podaną hipotezę? W RNA jest nukleozyd urydyna, a w DNA deoksyurydyna, innymi słowy heterodupleks DNA i RNA jest czymś innym niż dwuniciowy DNA zawierający deoksyurydynę. Czy w ogóle są silne przesłanki poparcia tezy, że w świecie RNA występował on w dwuniciowej a nie w jednoniciowej formie?

4. Nie znalazłam w literaturze informacji o potwierdzeniu hipotezy iż wirusy glonów degradują chromosom swojego gospodarza, aby zapobiec superinfekcji. Wręcz przeciwnie, znalazłam opisy eksperymentów temu przeczące. Ponadto dane literaturowe sugerują, że degradacja DNA gospodarza jest sposobem na przestawienie transkrypcji na wirusową. Prosiłabym więc Doktorantkę o komentarz.

5. Wydaje mi się, że przyjęte w literaturze określenie „sieroca” (ang. *solitary, orphan*) metylotransferaza DNA odnosi się do takiej, której nie towarzyszy enzym restrykcyjny (nie jest częścią systemu R-M). Czy Doktorantka mogłaby podać przykład jakiegoś genomu bakteryjnego kodującego metylotransferazę CcrM, której towarzyszy niefunkcjonalna endonukleaza restrykcyjna? W dysertacji CcrM została podana jako przykład tak właśnie opisanej metylotransferazy DNA.

Jeszcze jedno pytanie, czy są dane literaturowe dotyczące ewentualnej konkurencji pomiędzy systemami R-M znajdującymi się w tej samej komórce? Niektóre bakterie mają ich kilka czy nawet kilkanaście, a ponadto wiele wskazuje, że są to samolubne elementy genetyczne.

Rozdział Materiały oraz rozdział Metody przedstawione są bardzo wyczerpująco. Ta część pracy, dość obszerna, zawiera wszystkie niezbędne informacje. Protokoły opisane są w sposób pozwalający na powtórzenie wszystkich etapów badań. Zastosowane procedury nie budzą moich zastrzeżeń. Czytając ten rozdział zwróciłam uwagę na ogrom pracy włożonej przez mgr. Wilkowską w wykonanie badań. Stworzyła ona ponad 30 nowych konstruktów plazmidowych. Ponadto zastosowała, podczas wykonywania pracy, wiele różnych technik badawczych i analitycznych, czasem napotykać na problemy, które na bieżąco w opisie dyskutowała. Zastosowane techniki wydają się dość prostymi (oprócz qPCR to w zasadzie klasyczne metody biologii molekularnej i mikrobiologii), ale pracochłonnymi, ze względu na bardzo dużą liczbę (pomysłowo) użytych konstruktów plazmidowych.

Wyniki. W pracy uzyskano szereg bardzo interesujących i wartościowych wyników, Dzięki użyciu, wspomnianej wyżej serii konstruktów plazmidowych, a także różnych wariantów szczepów *Escherichia coli*, na modelu systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI, mgr Wilkowska wykazała jak istotna jest optymalizacja ekspresji metylotransferazy

DNA oraz endonukleazy restrykcyjnej. Pokazała również jak łatwo rozchwiać tę subtelną równowagę poprzez różne modyfikacje elementów regulacyjnych – całego promotora czy tylko jednej z jego konserwowanej sekwencji. Istotnym osiągnięciem jest wykazanie wpływu poszczególnych elementów regulacyjnych, wchodzących w skład operonu EcoRI, na jego ekspresję, a także szeregu innych, które nie są jego częścią, ale po prostu znajdują się w jego sąsiedztwie.

Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty rzucają światło na warunki stabilizacji nowego dla komórki systemu R-M. Jeśli system R-M znajduje się na poza chromosomowym mobilnym elemencie (np. plazmidzie) problemem może okazać się, jak wykazała mgr Wilkowska, na przykład liczba kopii plazmidu. Z tego powodu, w szczególnej sytuacji, nie tylko system R-M, ale i sam plazmid może nie utrzymać się w komórce. Jeśli natomiast nowo nabywany system R-M jest wprowadzany do chromosomu o poziomie ekspresji, kodowanych przez niego genów, mogą zdecydować elementy regulacyjne sąsiedztwa miejsca jego integracji.

Mgr Witkowska zademonstrowała również warunki (tj. wysoki poziom ekspresji genów R-M EcoRI), w których stabilny w komórce system, postulowany jako obronny (chroniący integralność chromosomu) staje się toksyczny (doprowadza do degradacji chromosomu).

Uzyskane rezultaty pozwalają również na refleksję iż systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II, które prawdziwy boom zainteresowania mają dawno za sobą (lata 80-90 XX wieku), kryją przed nami jeszcze wiele tajemnic, dlatego wciąż, w mojej opinii, pozostają niezwykle ciekawym modelem badawczym.

W końcowej części pracy mgr Wilkowska sformułowała 9 wniosków, które zostały wypunktowane w Podsumowaniu. Wnioski te są merytorycznie poprawne i znajdują oparcie w wynikach badań Doktorantki. Można je również uznać za najistotniejsze osiągnięcia przedłożonej dysertacji.

Chciałabym podkreślić, że dorobek naukowy Doktorantki obejmuje publikację (w której jest pierwszym autorem) w bardzo dobrym czasopiśmie *DNA Research* (IF 4,0) *Low-level expression of the Type II restriction-modification system confers potent bacteriophage resistance in Escherichia coli*. Wilkowska K, Mruk I, Furmanek-Błaszcz B, Sektas M. *DNA Res.* 2020;27(1):dsaa003., która zawiera wyniki prezentowane w ocenianej rozprawie, co jest to dodatkowym potwierdzeniem wartości naukowej przedstawionych badań.

Natomiast z przykrością zauważyłam pośpiech i brak należytej staranności w ostatecznej redakcji dysertacji. W tekście pozostały bardzo liczne usterki gramatyczne, składniowe i stylistyczne oraz lapsusy językowe. Praca zawiera też liczne błędy edytorskie, które wpływają na odbiór merytoryczny treści zawartych w pracy. Wyeliminowanie tych błędów i usterek pozwoliłoby na łatwiejsze skoncentrowanie uwagi czytelnika na meritum. Pozwolę sobie na wskazanie przykładów:

1. Używanie pojęcia „restrykcja”. W moim odczuciu jest to kalka z języka angielskiego, a w języku polskim to słowo ma inne znaczenie. Ale, chociaż trochę mi przeszkadzało, było ono konsekwentnie używane.

2. Używanie pojęcia „efektywny” (z reguły w kombinacji ze słowem restrykcja). W języku polskim jest to synonim określenia „wydajność” jednakże w odniesieniu do reakcji biochemicznych, ekspresji, produkcji, mechanizmów biologicznych zdecydowanie lepszym (i najczęściej używanym) jest właśnie określenie „wydajność” (tj. wytwarzanie czegoś w dużej ilości). Niestety Doktorantka nadużywała pojęcia „efektywny” umieszczając go w przeróżnych kontekstach, co skutkowało kuriozalnymi językowo konstrukcjami. W większości wypadków

wystarczyłoby usunąć słowo „efektywny”, albo zamienić je na słowo „poziom”. Poniżej seria przykładów [w nawiasie moja propozycja poprawy]:

- s. 90 niski poziom efektywności restrykcji [niski poziom restrykcji]
- s. 92 brak zdolności do efektywnej restrykcji [niski poziom restrykcji]
- s. 98 przyczyna różnicy w efektywności restrykcji [przyczyna różnicy w poziomie restrykcji]
- s. 98 wpływ na poziom efektywności transkrypcji [wpływ na poziom transkrypcji]
- s. 99 wysokość efektywnej restrykcji [wydajność restrykcji]
- s. 100 badanie relatywnej efektywności promotora [badanie siły promotora]
- s. 117 tylko nieznaczna efektywność restrykcji [niski poziom restrykcji]

3. Przykłady nieporadności językowej [w nawiasie propozycja poprawy]:

- s. 5 restrykcja był niższa o 3 rzędy różnicy
- s. 5 możliwa jest odwracalna zmiana funkcjonalnej efektywności systemu
- s. 23 wyszczególniono kilka podtypów [wyróżniono]
- s.24 na system R-M typu IV przypada jeden lub dwa geny
- s.24 cięcie przebiega w odległości ok. 30 nt [ma miejsce]
- s.28 brak wzoru metylującego
- s.29 Drugim mechanizmem regulacyjnym jest jej rola
- s.32 podczas zajmowania miejsca w komórce
- s.35 dwa promotory, z których zachodzi początek transkryptu
- s.90 Maksymalna wartość restrykcji została zbadana. [Kontrola, punkt odniesienia. Bakterie bez systemu R-M, tu uzyskano maksymalne miano]
- s.106 podjednostki promotora (-35 oraz -10) [segmenty, konserwowane sekwencje]
- s.106 delecja konserwatywnej tyminy [konserwowanej]
- s. 111 przekroczenie poniżej progu optymalnego poziomu
- s. 112 jest to zależne wprost od poziomu [bezpośrednio]
- s.113 operon EcoRI zlokalizowany na plazmidzie pIM-RM kilkakrotnie zapewnia wyższy poziom produkcji endonukleazy restrykcyjnej
- s. 114 Kontrolą stanowiącą brak genu reporterowego były komórki *E. coli*
- s. 141 Wyniki tej pracy odnośnie powiązania funkcjonowania systemu R-M [w odniesieniu do]
- s. 141 należy mieć świadomość
- s. 143 W innych spokrewnionych plazmidach rejon w obrębie miejsca wiązania XerD w ogóle nie stwarza możliwości dla zaistnienia potencjalnej sekwencji -35
- s. 144 Wyniki efektu ekspresji
- s. 145 Z uzyskanych w tej pracy wyników wydaje się,
- s, 145 akty autodestrukcji chromosomu
- s. 148 kolonie bakterii z plazmidem [...] mają skłonność
- s. 148 pozwoliły na porównanie stopnia utrzymywania się plazmidów [stabilności]
- s. 148 zróżnicowany efekt żywotności komórek
- s. 148 powoduje presję na utratę plazmidu
- s. 148 w przypadku testu, w którym plazmid pIM-RM znacznie szybciej ulegał eliminacji z komórek bakteryjnych na tle szczepu defektywnego w R-M [w odniesieniu do]

4. Przykłady nieściśłości/błędy merytoryczne:

- Enzym Mom nie przyłącza grupy metylowej do adeniny w sekwencji GATC

- bakteriofagi *Bacillus* **PBS1** oraz PBS2, a nie PSB1 oraz PSB2
- chlorella wirus **PBCV-1** a nie BCV-1
- s. 19 podrozdział Funkcje systemów R-M: „endonukleazy restrykcyjne [...] mogą przeprowadzać cięcie poza sekwencją rozpoznawaną, co opisuje się jako aktywność typu star”. To jest przekłamanie. Endonukleazy restrykcyjne typu I i III ZAWSZE przeprowadzają cięcie poza sekwencją rozpoznawaną (i nie nazywamy tego aktywność typu star). Endonukleazy restrykcyjne typu IIS również przeprowadzają cięcie poza sekwencją rozpoznawaną.
- s. 21 „metylotransferaza wpływa na ekspresję czynników” **wirulencji**, a nie wirusowych, co wpływa na patogenność niektórych bakterii (przykład – ekspresja operonu pap)
- s. 21 „do tej pory opisano ponad 5 tys. systemów R-M (baza REBASE)
- s. 22 W podrozdziale „Systemy R-M typu I” - „Produkt ostatniego z genów, hsdR, jednocześnie z pozostałymi dwoma warunkuje restrykcję w obrębie specyficznej sekwencji DNA”. Nieprawda, gdyż endonukleazy typu I tną DNA poza sekwencją rozpoznawaną.
- s. 22 „Cechą charakterystyczną systemów typu II jest strukturalna i funkcjonalna rozdzielność”. Dokładnie to samo można powiedzieć o enzymach typu I i III, które składają się z (odrębnych) polipeptydów. Dodatkowo, to twierdzenie jest nieprawdziwe w przypadku dość dużej grupy systemów typu II, które łączą aktywności endonukleolityczną i metylującą w jednym wspólnym polipeptydzie (podtypy IIC oraz niektóre IIB)
- s. 14 „Bakteriofagi w odpowiedzi na obecność systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych **wytworzyły** zróżnicowane mechanizmy”
- s. 14 „Bakteriofagi **produkuja** również własne białka”
- s. 15 „Bakteriofagi **wywoluowały** mnóstwo mechanizmów”
- s. 15 „bakterie **wywoluowały** nietypowe endonukleazy restrykcyjne”

5. Przykłady kalek z języka angielskiego:

- protekcja [ochrona]
- s. 36 „bliskość położenia czyni potrzebę omówienia jego budowy”
- boxy [segmenty, odcinki]

6. Przykłady skrótów myślowych:

- s. 101 „aktywny proces antyterminacji ma niewielki wpływ na zwiększenie wydajności restrykcji wirusowego DNA w plazmidzie pACYCeco”
- s. 105. Podpis pod ryc. 21: „Wykres przedstawia wyniki miana bakteriofaga λ uzyskanych dla bakterii z plazmidami dla plazmidów pACYCeco, pIM-RM oraz pACYC184 (R-M-) uzyskanych w bakteriach (od prawej) *E. coli* wariant *argR* (DS956), *pepA* (DS957), *xerC* (DS9008), *xerD* (DS981) oraz szczep typu dzikiego (AB1157).”
- s. 107 „pomimo jego nukleotydowego potencjału w pozycji -14 i -16”
- s. 107 „przedłużony promotor -10”

7. Przykłady uchybień edytorskich:

- s. 1010. Podpis pod ryc. 25: „Lizaty bakteryjne z odpowiednimi lizatami rozdzielono na [...] żelu”
- s. 124. Nie usunięto fragmentu niedokończonego zdania: „Przygotowane preparaty mikroskopowe komórek”

- s. 129 "Autorestrykcja komórkowego DNA w komórkach z wysokim poziomem metylotransferazą EcoRI"
- s. 133 Zdanie dla mnie niezrozumiałe: „Potwierdzeniem różnego poziomu produkcji między R-M a odmiennych zdolności do metylacji komórkowej..”
- s. 23 brak numeru odniesienia do Tabeli [1]
- s. 27 użycie (znieśnacka) skrótu RE, a na s. 28 skrótu MT.

8. Antropomorfizm – nagminne używanie określenia „posiadać”.

9. Literówki np. w podpisach do rysunków 11 i 20.

10. Nagminne używanie określenia „cel”. W większości wypadków użycie tego słowa w opisie metod (użycie kilkadziesiąt razy) było zbędne np. „celem zapobiegnięcia wzrostowi bakteryjnemu” [aby zapobiec], „po worteksowano celem otwarcia komórek bakteryjnych”. Natomiast największe zastrzeżenie mam do używania określenia „cel” aby uzasadnić celowość istnienia jakiegoś zjawiska czy działania jakiegoś biologicznego mechanizmu. Przykłady (głównie z rozdziału Wstęp):

- Endonukleaza ma na celu przecięcie nici DNA
- [systemy abortywnej infekcji] Mają one na celu zakłócenie replikacji bakteriofaga,
- [blokowanie iniekcji obcego DNA] ma [...] na celu niedopuszczenie do zainfekowania komórki innymi bakteriofagami.
- [enzymy] mają na celu restrykcję każdego inwazyjnego DNA
- pierwotna zmiana z materiału genetycznego typu RNA do DNA wystąpiła w bakteriofagach celem uniknięcia mechanizmów obronnych bakterii
- celem zapobiegnięcia autorestrykcji materiału genetycznego
- celem obniżenia jej ekspresji
- mają na celu inhibicję

Nawiązując do powyższej krytycznej uwagi chciałabym poznać opinię Doktorantki na temat celowości ewolucji i w ogóle celowość w przyrodzie.

Na zakończenie muszę podkreślić, że moja ogólna ocena pracy doktorskiej jest w pełni pozytywna. Większość moich krytycznych komentarzy dotyczyła kwestii edytorskich i językowych (wynikały one głównie z obowiązku recenzenta), co nie wpłynęło na ocenę merytoryczną wartości rozprawy. Uwagi te nie podważają uzyskanych wyników i poprawności ich interpretacji. Podsumowując, dysertację mgr Wilkowskiej należy uznać za samodzielnie rozwiązany problem badawczy przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymogiem stawianym rozprawom doktorskim.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stanowi też dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę prac naukowych w zakresie biologii molekularnej bakterii. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Karoliny Wilkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Monika Radlińska