

prof. dr hab. Dariusz Bartosik
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1
02-096 Warszawa

2015 04. 07

Warszawa, 02.05.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Wons pt.
„Analiza specyficzności metylotransferazy DNA EcoVIII oraz jej homologów ”
wykonanej w katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem
prof. dr. hab. Tadeusza Kaczorowskiego.

Systemy restrykcji i modyfikacji występują powszechnie w genomach większości bakterii. Przypisuje się im głównie funkcje ochronne, zabezpieczające komórki bakteryjne przed infekcją fagowym DNA. Często są one jednak również postrzegane: (i) jako samolubne elementy genetyczne, (ii) jako systemy stabilizujące strukturę wysp genomowych oraz ruchomych elementów genetycznych, czy też (iii) jako moduły, które, ograniczając zakres wymiany DNA, zapewniają odrębność genetyczną bakterii i zachowanie jedności gatunku. Nie sposób zatem jednoznacznie zaszklifikować te systemy, bowiem chociaż z jednej strony stanowią one barierę dla horyzontalnego transferu genów, to jednak, poprzez pofragmentowanie egzogennej informacji genetycznej, promują zdarzenia rekombinacyjne, umożliwiające wbudowanie powstałych fragmentów DNA do genomu komórki gospodarza.

Systemy te pełnią więc ważne funkcje biologiczne, dlatego też zainteresowanie nimi wykracza daleko poza praktyczne zastosowania kodowanych przez nie endonukleaz restrykcyjnych. Szczególnie intensywnie analizowane są komponenty systemów R-M typu II, które dominują liczebnie w genomach bakteryjnych. Systemy te są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem struktury, jak i sekwencji aminokwasowych endonukleaz i metylotransferaz DNA. Co intrygujące, mimo tak znaczących różnic, odmienne systemy wykazują często identyczną specyficzność względem rozpoznawanej sekwencji nukleotydowej, co czyni je doskonałym modelem do przeprowadzenia bardziej dogłębnych analiz porównawczych, dotyczących zarówno struktury kodowanych enzymów, jak i molekularnych podstaw ich oddziaływań z DNA.

W pracy, którą powierzono mi do recenzji, analizom takim poddano cztery homologiczne metylotransferazy DNA systemów R-M typu II, występujące w różnych gatunkach bakterii, reprezentujących dwa odległe filogenetycznie typy taksonomiczne - *Proteobacteria* (klasa *Gammaproteobacteria*) i *Firmicutes* (klasa *Bacilli*). Analizowane metylotransferazy rozpoznają tę samą sekwencję nukleotydową i modyfikują ją w identyczny sposób, jednak, jak wynikało z

badan wstepnych, ruznia sie kilkoma istotnymi wlasciwosciami, wskazujacymi m.in. na odmiennosc ich struktur trzeciorzadowych.

Uwazam, ze zarowno wykorzystanie ww. metylotransferaz DNA jako obiektu badawczego, jak i dob6r zadan badawczych i warunk6w eksperymentalnych, byly bardzo trafne i doprowadzily do wskazania element6w istotnych dla interakcji analizowanych bialek z DNA. Nalezy podkreślić, ze recenzowana rozprawa doktorska powstala pod opieką promotorską prof. Tadeusza Kaczorowskiego, kierujacego jedna z wiodacych grup badawczych w naszym kraju, specjalizujacych sie w badaniu system6w restrykcji i modyfikacji. Wyniki przedstawione w ocenianej pracy stanowia zatem rozwinięcie wcześniejszych analiz, a zarazem wnosza wartosciowe treści do ogólnej wiedzy na temat specyficzności substratowej metylotransferaz DNA.

Ocena gl6wnych części rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 209 stron i ma układ typowy dla większości prac eksperymentalnych. Wydzielono w niej 5 gl6wnych rozdział6w, tj. *Wstępn*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki wraz z Podsumowaniem*, *Dyskusję i Literaturę*, które poprzedzono *Streszczeniem*, w języku polskim i angielskim.

Wstępn

Wstępn rozprawy sklada sie z pięciu równocennych części. W pierwszej z nich przedstawiono ogólną charakterystykę metylotransferaz, opisano ich strukturę oraz układ konserwowanych motyw6w i domen, a takze molekularne podstawy katalizowanych przez nie reakcji, z uwzględnieniem różnic zaobserwowane dla metylaz egzo- i endocyklicznych. W kolejnym rozdziale opisano oddziaływania metylotransferaz z DNA, które determinują rozpoznanie specyficznych sekwencji. Następnie scharakteryzowano hybrydy DNA/RNA, zapoznano czytelnika pokr6tce ze zjawiskiem rozluźnionej specyficzności enzym6w restrykcyjno-modyfikacyjnych względem sekwencji nukleotydowej, a w końcowej części opisano biologiczną rolę metylacji DNA, kładąc szczególny nacisk na znaczenie, funkcje i klasyfikację system6w restrykcji i modyfikacji. Wątkiem przewodnim Wstępn są więc metylotransferazy DNA, dlatego też początkowo niezrozumiałe było dla mnie umieszczenie w tym rozdziale opisu struktury hybryd6w DNA-RNA, bez wyraźnych odniesień do zjawiska metylacji. Dopiero po lekturze części wyników rozprawy, w których badano wpływ metylotransferaz na tego typu hybrydy, zrozumiałem w pełni zamysł Autorki.

Podsumowując podkreślę, że Wstępn stanowi wystarczające wprowadzenie do tematyki badan przedstawionych w rozprawie. Moja drobna uwaga dotyczy jedynie błędnego użycia terminu „archebakterie” zamiast archeony (str. 27). Mam też pytanie odnoszące się do stwierdzenia ze str. 31, które brzmi: „Samolubność system6w RM, wraz z ich cechami jak kodowanie stabilnej toksyny (endonukleazy restrykcyjnej) i labilnej antytoksyny (metylotransferazy DNA)

pozwala na zaklasyfikowanie ich do grupy układów toksyna-antytoksyna". Według dostępnych mi danych, posegregacyjne funkcje stabilizujące systemów R-M typu II, w przeciwieństwie do systemów toksyna-antytoksyna, nie wynikają z różnicy stabilności endonukleaz i metylotransferaz, lecz ze stopniowego rozcieńczania w cytoplazmie obu komponentów białkowych, podczas kolejnych podziałów komórek, które utraciły system R-M. Poproszę o komentarz w tej kwestii.

Cel pracy

Przedstawiony w rozprawie Cel pracy nie odzwierciedla, moim zdaniem, celu naukowego jaki przyświecał podjętym badaniom. Przeprowadzenie analizy specyficzności substratowej metylotransferaz DNA, nie powinno być celem samym w sobie, lecz powinno prowadzić do uzyskania odpowiedzi pomocnych w rozwiązaniu odpowiednio postawionego problemu naukowego. W obecnej formie cel pracy przedstawia w zasadzie sprecyzowane zadania badawcze, które nie informują czytelnika, z jaką myślą zostały zaplanowane. Odpowiednio sformułowany cel naukowy został za to podany w pierwszym zdaniu rozdziału Dyskusja, które informuje, że „przeprowadzona w pracy analiza metylotransferaz DNA homologicznych względem M.EcoVIII miała na celu ustalenie na ile fakt rozpoznawania identycznej sekwencji nukleotydowej znajduje odzwierciedlenie w strukturze i właściwościach metylotransferaz oraz wyjaśnienie specyficznego klucza oddziaływań białko-DNA”.

Materiały i Metody

Materiały i Metody przedstawiono w pracy w dwóch odrębnych rozdziałach. Do badań wykorzystano wyłącznie szczepy oraz plazmidy w pełni zdefiniowane pod względem genetycznym. Opisy metod przedstawiono na tyle precyzyjnie, aby możliwe było powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów w innych warunkach laboratoryjnych. Mam jednak pewne zastrzeżenia do tej części pracy. Przede wszystkim uwagę zwraca umieszczenie w obu rozdziałach ośmiu Tabel, które nie zostały odpowiednio oznaczone, tj. brak numerów, tytułów i przypisów (np. pod Tabelą na stronie 38 powinno znaleźć się wyjaśnienie, dlaczego niektóre nukleotydy w podanej sekwencji przedstawiono czcionką o innym formacie). W rozdziale Materiały nie zamieszczono ponadto informacji o enzymach, markerach wielkości DNA i białek oraz zestawach wykorzystywanych w pracy z DNA, nie podano również spisu odczynników i buforów stosowanych np. przy oczyszczaniu białek czy określaniu aktywności enzymatycznej metylotransferaz. Kolejne uwagi dotyczą, po pierwsze, braku opisu plazmidu pEcoVIIIIM (jest o nim wzmianka w tekście na stronie 43, lecz nie został ujęty w tabeli na stronie 34), po drugie, żargonowego określenia metody fosforylacji końców 5' nukleotydów mianem „kinazowania nukleotydów” (str. 50), i, po trzecie, stosowania w tekście błędnego terminu „sonifikacja”, który oznacza zastosowanie dźwięków niebędących mową do wyrażenia lub przetworzenia informacji (np. str. 43), zamiast terminu sonikacja, oznaczającego dezintegrację struktur komórkowych pod wpływem ultradźwięków.

Wyniki

Rozdział Wyniki stanowi zasadniczą część rozprawy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i objętościowym. Na 105 stronach przedstawiono analizy specyficzności substratowej czterech, wspomnianych wcześniej, metylotransferaz DNA. Do analizy włączono także delecyjną formę jednej z metylotransferaz, M. BstZI, pozbawioną unikatowej sekwencji przyległej do domeny TRD. Ponieważ w pracy próbowano przypisać rolę tej unikatowej sekwencji, a metylotransferaza BstZI pochodzi z bakterii termofilnej, chciałbym dowiedzieć się, czy testowano wstępnie aktywność metylującą tej izoformy w podwyższonej temperaturze. Dopytam jeszcze o genomową lokalizację genów analizowanych metylotransferaz. Ciekawi mnie, czy są one zlokalizowane w obrębie ruchomych elementów genetycznych lub wysp genomowych?

Badania rozpoczęto od oczyszczenia białek oraz określenia czynników wpływających na rozluźnienie ich specyficzności. Kolejne etapy obejmowały, ogólnie ujmując, analizę aktywności metylotransferaz względem sekwencji specyficznej i sekwencji drugorzędowych, zarówno w warunkach standardowych, jak i w warunkach rozluźnionej specyficzności, z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych substratów. Dzięki zastosowaniu całej gamy zmodyfikowanych oligonukleotydów, poczyniono ciekawe obserwacje, m.in. na temat istotności poszczególnych zasad i wiązań fosfodiesterowych w obrębie sekwencji kanonicznej oraz w jej bliskim sąsiedztwie, w oddziaływaniach z analizowanymi metylotransferazami. W świetle przedstawionych wyników można wnioskować, że każdy z tych izospecyficznych enzymów oddziałuje odmiennie z sekwencją docelową. Poszczególne enzymy wykazują też unikatowe, w analizowanej grupie, właściwości, co podkreśla Doktorantka w poszczególnych podrozdziałach pracy. Za szczególnie interesujące uznać można zdolność M.LlaCI do specyficznej modyfikacji nici DNA hybrydu DNA-RNA w warunkach typu „star” oraz możliwość metylacji przez M.EcoVIII kanonicznej sekwencji, zlokalizowanej na jednoniciowym DNA. W końcowej części pracy przeprowadzono funkcjonalną analizę domeny TRD metylotransferazy EcoVIII, odpowiedzialnej za specyficzność rozpoznawania sekwencji docelowej. Dzięki konstrukcji i zbadaniu aktywności serii zmutowanych białek, wyróżniono aminokwasy pełniące najbardziej istotną rolę w zachowaniu struktury tej domeny. Recenzowana rozprawa doktorska przynosi zatem wiele ciekawych i wartościowych obserwacji, które, z jednej strony, przybliżają nas do zrozumienia molekularnych podstaw specyficzności substratowej badanych metylotransferaz, jednak z drugiej przekonują, że nie istnieje jeden, uniwersalny model tego typu oddziaływań. Zasadne jest zatem kontynuowanie tego typu analiz, najlepiej z wykorzystaniem enzymów o poznanej strukturze krystalograficznej.

Wyniki pracy zostały bogato zilustrowane, bowiem umieszczono w nich aż 80 często kilkupanelowych rycin i 3 tabele. Specyfika przeprowadzonych badań i zastosowanie wielu wariantów eksperymentalnych umożliwiły uzyskanie dużej ilości danych. Uważam jednak, że szczegółowe wyniki niektórych eksperymentów, zwłaszcza tych, w które nie wykazały istotnych różnic w aktywności analizowanych enzymów, powinny zostać przeniesione do odrębnego załącznika (np. dane z rozdz. 6.7, str. 134-148). Niewątpliwie wpłynęłoby to pozytywnie na przejrzystość tej części pracy.

Z obowiązku recenzenta zwrócić jeszcze uwagę na nieliczne błędy językowe i edytorskie, np. (i) stosowanie terminu „primery” zamiast startery (str. 134), (ii) „wiązaną białka do DNA” zamiast wiązanie z DNA (str. 134), czy też (iii) nazwanie domeny polihistydynowej „ogonkiem histydynowym” (str. 148). Ponadto w legendzie ryciny 15 na str. 66 zabrakło opisu paneli A i B. Wydaje mi się również, że nazwa rozdziału 6.2. (str. 65) „Próba odwrócenia aktywności typu star” nie oddaje w pełni idei doświadczenia, bowiem nie chodziło tu o „odwrócenie efektu”, lecz jego ograniczenie bądź zniesienie poprzez zastosowanie zoptymalizowanego buforu w mieszaninie reakcyjnej.

Dyskusja

Uzyskane wyniki przedyskutowano dogłębnie w kolejnych częściach rozdziału Dyskusja, punktując jednocześnie najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy. Lektura tego rozdziału przekonuje mnie, że Doktorantka jest w pełni dojrzałym badaczem, zdolnym nie tylko do przeprowadzenia ciągu złożonych analiz eksperymentalnych, lecz również do wnikliwej i krytycznej interpretacji uzyskanych wyników, a także przedstawienia ich na tle aktualnej wiedzy z danej dziedziny. W rozdziale tym znalazłem też odpowiedzi na kilka pytań, które nasunęły mi się podczas analizy wyników rozprawy.

Podsumowując, chciałbym zaznaczyć, że nieliczne krytyczne uwagi zawarte w recenzji absolutnie nie wpływają na moją ogólną, wysoce pozytywną ocenę całej rozprawy. Przedstawione w niej badania wnoszą wiele nowych danych na temat specyficzności substratowej izospecyficznych metylotransferaz DNA, a tym samym przyczyniają się do lepszego poznania mechanizmów funkcjonowania całych modułów restrykcji i modyfikacji. Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się więc do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Ewy Wons do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

