

wpis. l.m. 7.5.2018

INSTYTUT



BiolMed

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk

w Łodzi

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723610
fax.: 042 2723630

e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

poniedziałek, 30 kwietnia 2018

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Klaudii Milewskiej „Wpływ odpowiedzi ścisłej na zdolności przystosowawcze bakterii do zmiennych warunków środowiska”.

Zdolność adaptacji do zmieniających się warunków stanowi o możliwości przetrwania drobnoustrojów w środowisku, zarówno w przypadkach bakterii saprofitycznych jak też obligatoryjnych patogenów. Zmiany warunków wzrostu wywołują zmiany w aktywności metabolicznej bakterii, optymalne dla danego środowiska. Adaptacja bakterii do zmieniających się warunków jest procesem ściśle regulowanym, zależnym od zdolności do odbioru zewnętrznych bądź wewnątrzkomórkowych sygnałów, które będą uruchamiać zmiany w poziomie ekspresji genów poszczególnych regulonów. Ważnym elementem stanowiącym o zdolności bakterii do szybkiego i skutecznego przystosowania się do zmian, związanych najczęściej z niedoborem składników pokarmowych, jest odpowiedź ścisła, proces stanowiący przedmiot zainteresowania Doktorantki.

Pani Klaudia Milewska skoncentrowała swoje badania na procesach zależnej od odpowiedzi ścisłej regulacji ekspresji tRNA u *E. coli* oraz na wstępnej charakterystyce odpowiedzi ścisłej u bakterii morskich. Badania swe Doktorantka mogła oprzeć o ogrom wiedzy i doświadczenia w badaniach odpowiedzi ścisłej zgromadzony w poprzednich latach w Katedrze Biologii Molekularnej, w tym także przez Panią promotor pracy, prof. Agnieszkę Szalewską – Pałasz.

Biorąc pod uwagę brak pełnej charakterystyki zależności odpowiedzi ścisłej i regulacji ekspresji panelu bakteryjnych tRNA a także, brak jakiegokolwiek wiedzy na temat procesów



odpowiedzi ścisłej u bakterii morskich postawione przed Doktorantką cele badawcze należy uznać za uzasadnione i niezwykle ciekawe.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący badanych drobnoustrojów oraz środowiska ich bytowania, procesów odpowiedzi ścisłej u *E. coli* oraz bakterii środowiskowych, roli ppGpp w regulacji ekspresji genów i znaczenia białek RelA, SpoT i DksA w tym kontekście, a także dotyczący promotorów tRNA.

Wstęp pracy jest napisany bardzo ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również głęboko przemyślany i ściśle związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi autorki.

W tym miejscu prosiłbym tylko Doktorantkę o poszerzenie, podczas obrony pracy, informacji zawartych na stronie 26 wstępu dotyczących mutacji w genach kodujących podjednostki polimerazy RNA w szczepach pozbawionych funkcjonalnych genów *relA/spoT*. **Czy mutacje te możemy określić jako kompensatorowe, oraz czy znany jest molekularny mechanizm związany z ich obecnością ?**

W rozdziale „Materiały i Metody” autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie całej gamy technik *in vitro* pozwalających na precyzyjne określenie zależności pomiędzy obecnością ppGpp i DksA a aktywnością promotorów tRNA, stabilnością kompleksów otwartych, wydajnością opuszczenia promotora przez polimerazę RNA czy wiązania polimerazy RNA do rejonu promotorowego. Bardzo dobrze zaplanowane i opisane zostały także badania związane z indukcją u bakterii morskich odpowiedzi ścisłej podczas stresu. Wachlarz zastosowanych w pracy technik molekularnych i hodowlanych pozwala przypuszczać, że Doktorantka w czasie realizacji pracy zdobyła szerokie doświadczenie zarówno w pracy z bakteriami jak i kwasami nukleinowymi.

Część eksperymentalną autorka rozpoczęła od określenia poziomu ekspresji >30 genów tRNA *E. coli* w fazie intensywnego wzrostu (OD₆₀₀-0,2) oraz podczas wchodzenia w fazę stacjonarną (OD₆₀₀-1,0), obserwując różny poziom hamowania transkrypcji.



Czy Doktorantka poprzedziła prezentowane badania wykonaniem krzywej wzrostu w badanych warunkach prowadzonej hodowli w celu określenia punktu wejścia w fazę stacjonarną? Jaki sens ewolucyjny może mieć nierównomierny spadek aktywności promotorów tRNA w fazie stacjonarnego wzrostu, czy nie jest to „rozrzutność” z punktu widzenia metabolizmu bakterii? Czy określany był poziom ppGpp w badanych warunkach, jeśli nie to czy nie należałoby mówić o warunkach fazy stacjonarnej a nie o „wzroście poziomu ppGpp” (str. 89 pod ryciną)?

W dalszej części pracy Doktorantka określiła aktywność promotorów tRNA w obecności ppGpp i/lub DksA metodą transkrypcji in vitro, obserwując, z wyjątkiem *serU*, antagonistyczny efekt wywołowany obecnością badanych czynników. **Prosiłbym Doktorantkę o informację dotyczącą fizjologicznych stężeń ppGpp i DksA w komórkach *E. coli*.** Z badań in vitro wydawałoby się, że najaktywniejszy transkrypcyjnie w fazie stacjonarnego wzrostu powinien być gen *serU*, w badaniach in vivo okazało się natomiast, że ma on poziom ekspresji zbliżony do średniej. **Jak Doktorantka tłumaczy obserwowane rozbieżności pomiędzy wynikami in vivo i in vitro?** Autorka przeprowadziła następnie badania stabilności kompleksów otwartych rejonu promotorowego i polimerazy RNA, badania wydajności opuszczania rejonu promotorowego przez polimerazę RNA w obecności czynników odpowiedzi ścisłej oraz badania wiązania polimerazy RNA do rejonu promotorowego. Z analizy uzyskanych wyników można stwierdzić, że brak jest jednego uniwersalnego mechanizmu regulacji poprzez ppGpp i DksA dla wszystkich genów tRNA, proces ten może następować poprzez destabilizację kompleksów otwartych czy wpływ ppGpp na wiązanie lub opuszczanie rejonu promotorowego.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki w tej części pracy to bardzo cenny zbiór danych o działaniu regulatorów odpowiedzi ścisłej na transkrypcję promotorów tRNA, których aktywność jest kluczowa dla adaptacji komórki do warunków środowiska.

Ciekawy jestem czy Doktorantka rozważała konstrukcje rekombinowanych szczepów *E. coli* noszących wybrane geny tRNA pod kontrolą promotorów innych tRNA (odmiennie regulowanych przez ppGpp i DksA), np. *valU* pod kontrolą *serU* i odwrotnie z określeniem poziomu ich ekspresji in vitro i in vivo? Ciekawa mogłaby też być mutageneza sekwencji dyskryminatora, dająca bardziej bezpośrednie dowody dotyczące jej ewentualnej roli w wydajności transkrypcji w badanych promotorach.



W drugiej części pracy Doktorantka przeprowadziła badania porównawcze *in silico* genów związanych z odpowiedzią ścisłą w genomach bakterii morskich, oceniła możliwość syntezy ppGpp przez rybosomy wybranych gatunków bakterii, oraz określała syntezę ppGpp w warunkach stresu przez badane drobnoustroje. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że każdy z analizowanych gatunków bakterii morskich posiada dwa homologie *rsh* posiadające domeny kluczowe (z jednym wyjątkiem) dla reakcji syntezy i hydrolizy ppGpp oraz że homologie RelA tych gatunków bakterii posiadają sekwencję aminokwasową przynajmniej w 50% zgodną z sekwencją odpowiedzialną za wiązanie rybosomu w białku RelA *E. coli*. Autorka dla każdego z badanych szczepów wykazała zdolność do syntezy ppGpp oraz określiła rodzaj stresu indukujący taką syntezę. **Ciekawy jestem jak Doktorantka tłumaczy obserwowaną kinetykę indukcji syntezy ppGpp u *Vibrio harveyi* (produkt widoczny po 30 i 60 ale nie po 90 i 120 min.) podczas szoku termicznego i głodu węglowego ?**

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę i opisane w Podsumowaniu pracy, mają silne podstawy w prezentowanych wynikach i można uznać je jako w pełni uprawnione. Szkoda, że Doktorantka nie zdecydowała się na oddzielne (w postaci punktów) przedstawienie najważniejszych wniosków płynących ze zrealizowanych i opisanych badań.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Klaudii Milewskiej uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek