



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 21.06.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Rezulak, pt.

„Rola wyspecjalizowanego białka kontrolującego w regulacji ekspresji systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I z *Citrobacter* sp. RFL231”

wykonanej w Katedrze Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Iwony Mruk, prof. UG

Systemy restrykcji i modyfikacji (R-M) są bardzo powszechnym komponentem genomów bakteryjnych. Z jednej strony postrzegane są one jako samolubne moduły genetyczne, uzależniające od siebie komórki bakteryjne, natomiast z drugiej – przypisuje się im ważne funkcje biologiczne, które nie ograniczają się jedynie do ochrony ich gospodarzy przed inwazyjnym DNA. Systemy te są bardzo zróżnicowane, m.in. pod względem struktury genetycznej, wymaganych kofaktorów, rozpoznawanych sekwencji nukleotydowych i sposobu ich cięcia. Cechą wspólną, która decyduje o możliwości ich zaadaptowania i utrzymania w genomach nowych gospodarzy, jest precyzyjna regulacja ekspresji genów metylotransferazy (MTazy) i endonukleazy restrykcyjnej (REazy), co jest w pełni zrozumiałe, biorąc pod uwagę letalny efekt, jaki może wywoływać zaburzenie stechiometrii tych białek w komórce. Zdefiniowanie mechanizmów regulacyjnych jest zatem ważnym zadaniem badawczym, niezbędnym dla zrozumienia molekularnych podstaw funkcjonowania systemów R-M. Zagadnienie to stanowi wątek przewodni ocenianej rozprawy, w której za cel postawiono określenie sposobu regulacji ekspresji genów systemu R-M Csp231I (typu II) *Citrobacter* sp. RFL231, ze szczególnym uwzględnieniem roli kodowanego w tym *locus* czynnika transkrypcyjnego C, reprezentującego nową grupę białek regulatorowych.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Rezulak ma formę spójnego tematycznie opracowania o klasycznym układzie, typowym dla prac o charakterze eksperymentalnym, z podziałem na *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Wstęp*, *Cel naukowy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusję*, *Podsumowanie* i *Bibliografię*. Została ona przygotowana starannie, zarówno pod względem językowym jak i graficznym, z zachowaniem odpowiednich proporcji długości

poszczególnych rozdziałów. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych niedociągnięć, niezręcznych sformułowań czy uproszczeń, które jednak nie wpływają na pozytywny odbiór całości rozprawy.

Wstęp rozprawy w wystarczającym stopniu wprowadza czytelnika do tematyki badań. Pierwszy jego rozdział przynosi podstawowe informacje na temat systemów R-M, ich charakterystyki, klasyfikacji oraz roli jaką odgrywają w komórkach bakterii. Systemy te przedstawiono przez pryzmat hipotezy Hisato Kobayashiego, który zalicza je, wraz z systemami toksyna-antytoksyna (TA), do wspólnej grupy „samolubnych” modułów genetycznych. Dlatego też w drugiej części *Wstępu*, poświęconej mechanizmom kontrolującym powstawanie enzymów R-M, opisano liczne przykłady elementów regulatorowych systemów TA. Jest to w pełni zasadne, jednak powinno znaleźć również odzwierciedlenie w tytule głównego rozdziału (3.2), który został zbyt wąsko sformułowany: „Czynniki transkrypcyjne regulujące systemy R-M typu II”. W końcowej części *Wstępu* Autorka koncentruje uwagę na białkach C, pełniących rolę czynników transkrypcyjnych w grupie systemów R-M, do której zaliczono analizowany w rozprawie system Csp231I.

W pierwszym etapie opisanych badań Doktorantka, stosując podejście bioinformatyczne, zidentyfikowała w sekwencjach genomowych pulę genów kodujących białka C, pokrewne białku C.Csp231I. Analizy porównawcze tych *loci* pozwoliły na wyróżnienie konserwowanych motywów w sekwencjach aminokwasowych (aa) białek C, a także na wytypowanie sekwencji nukleotydowych o strukturze podwójnych palindromów, mogących stanowić potencjalne miejsce interakcji białek C z DNA (tzw. C-box). Predykcje te były punktem wyjścia do wstępnych eksperymentów, w trakcie których oczyszczono białko C, a następnie metodą EMSA wykazano jego zdolność do interakcji z DNA w obrębie regionu C-box. W analogicznych badaniach wykorzystano również dwa uzyskane w tej pracy zmutowane warianty białka C (ze zmienionymi aa w obrębie dwóch różnych motywów), które utraciły zdolność oddziaływania z DNA. Obraz elektroforetyczny oczyszczonych białek sugeruje, że utraciły one również silną tendencję do tworzenia form dimerycznych, obserwowaną w przypadku „dzikiego” białka (rycina 19). Czy znajomość struktury krystalograficznej białka C pozwala na wskazanie prawdopodobnej przyczyny tej zmiany?

Geny białka C i endonukleazy systemu Csp231I rozdzielone są krótkim regionem międzygenowym, w którym Doktorantka zidentyfikowała ważne sekwencje regulatorowe – dwa zachodzące na siebie promotory (R1 i R2) genu endonukleazy. Określono aktywność obu promotorów przy zastosowaniu plazmidu testowego oraz zmapowano miejsca ich startu

transkrypcji. Analogiczne badania przeprowadzono również dla promotorów genów białka C oraz metylotransferazy, co dało ogólne wyobrażenie na temat organizacji transkrypcyjnej analizowanego systemu.

Następnie, wykorzystując odpowiednie układy dwuplazmidowe, wykazano właściwości autoregulacyjne białka C, które, zależnie od stężenia, ma zdolność aktywowania bądź hamowania transkrypcji kodującego je genu. Ponadto, dzięki konstrukcji wariantów mutacyjnych regionu C-box możliwe było wyciągnięcie wniosków na temat roli poszczególnych palindromów-operatorów w regulacji ekspresji genu C.

Dalsze badania przyniosły kolejne obserwacje, istotne dla zrozumienia podstaw funkcjonowania analizowanego *locus*. Wykazano m.in. (a) powstawanie bicystronowego transkryptu genów białka C oraz REazy, (b) powstawanie dwóch form endonukleazy, w wyniku inicjacji translacji z udziałem różnych kodonów inicjatorowych, (c) uzyskano także dane świadczące o zróżnicowanej stabilności transkryptów białka C, REazy i MTazy, które były szczególnie istotne przy interpretacji wyników analiz relatywnego poziomu poszczególnych transkryptów w komórkach bakterii. Ważnym momentem w badaniach była również identyfikacja innych cząsteczek regulatorowych – antysensownych RNA kodowanych w obrębie genów białka C i REazy.

Dzięki konstrukcji licznych wariantów genetycznych systemu Csp231I niosących mutacje w regionach regulatorowych, monitorowaniu poziomu ekspresji poszczególnych genów w tych układach oraz badaniu *in vivo* ich aktywności biologicznej, Doktorantka poczyniła wiele obserwacji, których zespolenie pozwoliło jej na stworzenie całościowego modelu ilustrującego złożony mechanizm kontroli ekspresji genów systemu Csp231I. Okazało się, że system ten pod pewnymi względami odbiega od poznanych wcześniej układów regulacyjnych innych systemów R-M kodujących białka C. Poznanie i scharakteryzowanie poszczególnych elementów regulatorowych oraz stwierdzenie wielopoziomowego sprzężenia regulacyjnego z ich udziałem, niewątpliwie wprowadza nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat funkcjonowania i biologii systemów R-M.

Rozprawa pozostawia również kilka znaków zapytania, dotyczących np. (a) sposobu stymulacji aktywności promotora genu metylotransferazy przez białko C, prawdopodobnie przy braku interakcji tego białka z DNA regionu promotorowego, (b) mechanizmu negatywnego wpływu transkryptu białka C na aktywność promotora antysensownego RNA genu REazy, czy też (c) przyczyny utraty zdolności stabilizacji plazmidów w populacji bakterii niosących zmodyfikowane systemy R-M, mimo zachowania aktywności restrykcyjnej tych systemów. Te ciekawe obserwacje, wnikliwie przedyskutowane przez Doktorantkę, mogą stanowić dobry punkt wyjścia do dalszych badań.

Wyniki rozprawy zostały przedstawione w klarowny sposób, jako logiczny ciąg myślowy. Rozdział ten, jak i cała rozprawa, jest zajmującą lekturą, a dzięki identyfikacji kolejnych elementów regulatorowych i poszukiwaniu ich wzajemnych relacji, utrzymuje do końca ciekawość i zainteresowanie czytelnika. Nie mniej jednak mam kilka uwag do tej części rozprawy. Dotyczą one m.in.: (a) braku zaznaczonego zakresu stężeń induktora na rycinie 26, (b) błędnie wskazanych numerów starterów w legendzie ryciny 28, (c) wyników RT-PCR na rycinie 35 – brak negatywnej kontroli amplifikacji przy pozytywnym wyniku dla wszystkich prób badanych pozostawia pewną niepewność, (d) sugestii na temat ilości powstających w komórce transkryptów na podstawie jednostkowego wyniku amplifikacji DNA na matrycy cDNA (rycina 28). Uważam również, że nazwy rekombinowanych białek powinny informować czytelnika o obecności znacznika histydynowego – zastosowane w pracy oznaczenie CWT mylnie sugeruje, że mamy do czynienia z niezmienionym, „dzikim” białkiem C. Ponadto, na stronie 77 (2 akapit) opisano, dość ogólnikowo, badanie aktywności trzech promotorów (również w obecności *in trans* białka C) (rycina 25), prawdopodobnie z wykorzystaniem dwuplazmidowego układu, którego konstrukcję opisano i zilustrowano dopiero w dalszej części rozprawy (rycina 29). Opisy te należało w pewnym stopniu skompilować. Niektóre wyniki przedstawione na rycinie 25 i 30 można odebrać jako sprzeczne. Stwierdzenie w legendzie ryciny 25, że aktywność beta-galaktozydazy badano „w obecności C” silnie sugeruje zaindukowanie ekspresji białka C w komórce – wówczas wg tej ryciny białko C aktywuje ekspresję promotora P_c , a według danych z ryciny 30 – ma ono właściwości represora.

Rozprawę doktorską podsumowuje *Dyskusja*, w której Doktorantka rzeczowo i wyczerpująco omawia uzyskane wyniki i przedstawia je w kontekście aktualnych, odpowiednio dobranych pozycji literaturowych. Rozdział ten jest w mojej opinii bardziej odpowiednim miejscem na przedstawienie zaproponowanego przez Doktorantkę modelu kontroli ekspresji genów systemu Csp231I, który opisano w końcowej części *Wyników*. Dyskusja jest świetnie napisana i świadczy o rozległej wiedzy eksperckiej Autorki na temat systemów R-M, a także ogólnej wiedzy z zakresu genetyki i biologii molekularnej bakterii. W rozdziale tym znalazłem odpowiedzi na kilka pytań i wątpliwości, które pojawiły się w trakcie lektury *Wyników* rozprawy. Poprosiłbym jednak Doktorantkę o ustosunkowanie się w trakcie obrony do podanych niżej zagadnień:

1) Endonukleaza systemu Csp231I jest izoschizomerem REazy HindIII. Czy miejsca rozpoznawane przez ten enzym znajdują się również w sekwencji analizowanego systemu – a

jeśli są, jaka jest ich lokalizacja i czy ich metylacja może stanowić dodatkowy czynnik regulacji ekspresji genów białka C, REazy i MTazy?

2) Czy w genomach *Citrobacter* spp. i *E. coli* występują sekwencje palindromowe typu C-box niezwiązane z systemami R-M, z którymi mogłyby potencjalnie oddziaływać białka C? Doktorantka wspomina w Dyskusji o możliwości zakłócania ekspresji genów profaga przez białko C. Czy zmiany transkryptomu za sprawą tych czynników transkrypcyjnych mogą mieć znacznie szerszy zakres?

3) Przedstawione w rozprawie badania skupiają się głównie na operonie białka C i REazy, a w mniejszym stopniu na genie MTazy. Między ułożonymi „tail-to-tail” genami REazy i MTazy usytuowany jest zapewne terminator transkrypcji, co jednak nie wyklucza potencjalnej możliwości powstawania dłuższych transkryptów obejmujących sąsiednie geny. Transkrypty takie mogłyby pełnić wówczas także rolę antysensu, stanowiąc dodatkowy czynnik regulacyjny. Ciekawy jestem, czy wiadomo coś na ten temat? Poprosiłbym o uwzględnienie powstawania takich hipotetycznych transkryptów w stworzonym w pracy modelu kontroli ekspresji genów systemu Csp231I i omówienie ich potencjalnego wpływu na funkcjonowanie tego *locus*.

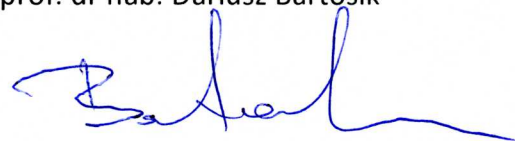
Podsumowując chciałbym określić, że rozprawę doktorską mgr Moniki Rezulak oceniam bardzo wysoko. Doktorantka zrealizowała postawione cele naukowe, uzyskując wyniki o dużej wartości poznawczej. Równie wysoko oceniam odpowiedni dobór metodyki, sposób zaplanowania i realizacji kolejnych zadań badawczych, a także interpretacji i krytycznej dyskusji uzyskanych wyników. O wartości naukowej rozprawy świadczy również fakt, że znaczna część jej wyników została opublikowana w uznanym periodyku *Nucleic Acids Research* (200 pkt. MEiN), a powstały artykuł został wyróżniony prestiżową nagrodą w konkursie im. prof. Kazimierza Bassalika, organizowanym przez Komitet Biologii Molekularnej Komórki Polskiej Akademii Nauk.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana rozprawa w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Rezulak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników, ich znaczenie nie tylko z punktu widzenia biologii systemów R-M, lecz również w

znacznie szerszym zakresie – regulacji ekspresji genów u bakterii, oraz opublikowanie tych wyników w uznanym periodyku o dużym stopniu oddziaływania w środowisku naukowym, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik



ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 318, faks: 22 55 41 402
e-mail: bartosik@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>