



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Biochemii Analitycznej
Dr hab. Benedykt Władyka, prof. UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Macieja Dylewskiego pt. „Rola małego RNA – GraL w regulacji ekspresji genów *Escherichia coli*”.

Praca doktorska Pana mgr. Macieja Dylewskiego została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Potrykus, prof. UG. Rozprawa dotyczy badań nad udziałem małego RNA (sRNA) – GraL w regulacji ekspresji genów i jest kontynuacją interesujących badań dotyczących ekspresji genu *greA*, kodującego czynnik transkrypcyjny u *Escherichia coli*, opublikowanych w 2010 roku w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Duża część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie została z kolei opublikowana w 2018 roku w *Acta Biochimica Polonica*, w artykule którego pierwszym autorem jest Pan Maciej Dylewski.

Ekspresja genów oraz regulacja tego procesu jest kluczowa dla wzrostu organizmów żywych i możliwości ich reakcji na sygnały ze środowiska, co w konsekwencji pozwala na skuteczną propagację ich materiału genetycznego. Wśród czynników kontrolujących te procesy są różnego rodzaju białka regulatorowe oraz drobne cząsteczki jak c-AMP. Stosunkowo niedawno do regulatorów ekspresji genów zaczęto zaliczać cząsteczki RNA, które w przypadku bakterii nazywane są sRNA. Są to jednoniciowe RNA o stosunkowo szerokim zakresie długości od kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów, zwykle nie ulegające translacji do białek. Regulacyjne mechanizmy działania sRNA są różnorakie, jednak można podzielić je na dwa typy: *in trans*, gdy działają w fizycznym oddaleniu od miejsca swojej lokalizacji genomowej i często zależne są od innych dodatkowych czynników (np. białek regulatorowych), oraz *in cis*, gdy oddziałują bezpośrednio z transkrypcyjnym z którego się wywodzą. Pomimo, że niektóre sRNA wykazują ewolucyjną konserwatywność to jednak ich różnorodność i brak łatwo identyfikowalnych cech wspólnych utrudnia ich bioinformatyczne przewidywanie oraz wykazywanie roli regulacyjnej i ewentualnych celów molekularnych. Wymusza to konieczność często żmudnej eksperymentalnej weryfikacji zakładanych cech, a ze względu na różnorodność i wielostopniowość potencjalnych mechanizmów regulacyjnych utrudnia jednoznaczne wykazanie roli w regulacji ekspresji genów. Z drugiej strony otwiera to pole do szerokiej gamy

eksperymentów i nowych odkryć w tej dziedzinie. Praca doktorska Pana Macieja Dylewskiego wpisuje się w ten niezbadany ciągle temat regulacji ekspresji genów za pomocą sRNA. Punktem wyjścia jest tu odkrycie sRNA (nazwanego GraL) będącego efektem przedwczesnej terminacji transkrypcji genu *greA*, kodującego czynnik transkrypcyjny. Nadekspresja GraL wpływa na transkryptom w fazie logarytmicznej oraz daje przewagę wzrostową nad komórkami typu dzikiego w eksperymentach typu wzrostu kompetycyjnego. Zasadnym zatem wydaje się być postawienie hipotezy, że GraL ma rolę w regulacji ekspresji genów u *E. coli*.

Licząca wraz z dodatkami ponad 130 stron praca doktorska ma układ klasyczny, składający się z streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników oraz dyskusji. Pracę kończy spis literatury zawierający 177 pozycji oraz wspomniany suplement, w którym zamieszczono sekwencje nukleotydowe związane z prezentowanymi materiałami i wynikami.

We wstępie Doktorant definiuje czym są sRNA oraz podaje drogi ich ewolucji i pochodzenia podając jednocześnie stosowne przykłady. W dalszej części omawia sRNA działające *in cis* i *in trans* oraz rolę białka Hfq w tych oddziaływaniach. Następnie skupia się na przedstawieniu GraL, który jest sRNA kodowanym w rejonie liderowym genu *greA* i znajduje się pod kontrolą dwóch zachodzących na siebie promotorów kontrolowanych z kolei przez czynniki $\sigma 70$ (P1) i σE (P2). Podano tu także prawdopodobne cele molekularne GraL zidentyfikowane za pomocą programu sTarPicker (tabela 1), które następnie weryfikowano doświadczalnie w dalszej części pracy. Końcowa część wstępu dotyczy białka GreA, gdzie przedstawiono jego budowę oraz rolę w procesie transkrypcji. Przedstawiono ponadto podstawowe informacje na temat transkrypcji. Ta część pracy jest spójna i zawiera szereg istotnych informacji dotyczących sRNA w tym samego GraL oraz białka GreA, które są wprowadzeniem teoretycznym do argumentacji zastosowanych podejść badawczych w dalszej części pracy. Co istotne rozdział ten został przygotowany w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe co wskazuje na bardzo dobre teoretyczne przygotowanie Doktoranta do tematyki będącej przedmiotem badań prezentowanych w dalszej części pracy. Należy podkreślić umiejętność syntetycznego zilustrowania podawanych informacji na panelowych rysunkach 1, 2 i 5. Natomiast zastanawiająca jest dysproporcja wielkości białka Hfq i RNA na rysunkach 3 i 4 oraz konwencja przedstawienia struktury białka GreA na rysunku 8, która przypomina literę P podczas gdy w tekście kształt ten opisywany jest jako podobny do litery L.

Cel i zakres pracy jest naturalną konsekwencją wyników wstępnych wskazujących na możliwą rolę GraL w regulacji ekspresji genów. Natomiast szeroki zakres planowanych eksperymentów jest pochodną złożoności mechanizmów regulacji ekspresji genów i wpływie dodatkowych czynników jak na przykład białek Hfq, CRP czy Nus.

Rozdział „Materiały i Metody” (24 strony) jest obszerny. Jego rozmiary nie wynikają jednak ze zbędnej rozwlekłości opisów ale z imponującej ilości wytworzonych materiałów (prawie dwieście rekombinowanych szczepów bakterii oraz dwudziestu konstruktów plazmidowych) oraz szerokiego wachlarza metod zastosowanych w niniejszej pracy. Świadczy to o kompleksowym podejściu Doktoranta do badań i umiejętności zastosowania wielu technik, w tym zaawansowanych metod biologii molekularnej. W ogromnej większości opis metod jest precyzyjny i wystarczająco wyczerpujący. Znajdują się tu też pewne uchybienia czy skróty, które mają wpływ na odczytywanie uzyskanych wyników. W szczególności opis badania aktywności β -galaktozydazy nie pozwala zorientować się czy za każdym razem pobierano taką samą ilość biomasy (według mnie nie), a to ma kluczowe znaczenie gdy wyniki prezentowane są w formie aktywności a nie aktywności specyficznej. Przy podawaniu składu mieszanin PCR nie podano stężenia (ewentualnie ilości) matrycy używanej do reakcji (tabele 10, 13, 20). Niefortunne jest też sformułowanie reakcja PCR w przypadku konstrukcji plazmidów nadprodukujących sRNA (punkt 4.2.7.3) oraz transkrypcji *in vitro* (punkt 4.2.9). Nie znalazłem też sekwencji startera KPr83 używanego w reakcji RATE-PCR. Użyteczne w mojej opinii było by przedstawienie tabeli z nazwami i koordynatami genomowymi genów, których ekspresję badano.

Rozdział „Wyniki” podzielony jest na trzy części (5.1 Poszukiwania molekularnych celów GraL, 5.2 Autoregulacja ekspresji genu *greA* przez białko GreA, oraz 5.3 Dodatkowe czynniki wpływające na regulację ekspresji genu *greA*). W części pierwszej przedstawiono wyniki badania wpływu nadprodukcji GraL na ekspresję 13 genów (zidentyfikowanych jako możliwe cele molekularne w oparciu o analizy za pomocą programu sTarPicker) zfuzjowanych z genem reporterowym β -galaktozydazy. Szczepy *E. coli* z delecją *lacZ* oraz dodatkowo z delecją *relA* i *spoT* (niezbędnych do produkcji alarmonu ppGpp, tetra fosforanu guanozyny) transformowano plazmidami (pochodne pRS414) kodującymi fuzje translacyjne rejonów genów prawdopodobnie oddziałującym z GraL oraz plazmidem pod kontrolą indukowalnego za pomocą IPTG promotora pozwalającym na nadekspresję GraL lub przetasowanej wersji GraL (Scr, scrambled), odpowiednio pGraL lub pScr. Pomiar poziomu ekspresji przeprowadzono za pomocą badania aktywności β -galaktozydazy w lizatach bakteryjnych z logarytmicznej i stacjonarnej fazy wzrostu. Doktorant zauważa tu szereg bardziej lub mniej znaczących różnic w ekspresji genów fuzyjnych będących wynikiem nadprodukcji sRNA, z których do dalszych szczegółowych analiz wybiera fuzje *gadB-lacZ*, *rpoS-lacZ* i *nudE-lacZ*. Ta część planowania eksperymentu, uzyskane wyników oraz ich interpretacja budzi jednak szereg wątpliwości. Proszę Doktoranta o szczegółowe ustosunkowanie się do nich. Po pierwsze dlaczego hodowle bakteryjne prowadzono w 30°C, podczas gdy ewentualną regulatorową rolę GraL we wcześniejszych badaniach (Potrykus i wsp., 2010) obserwowano w 37°C (mikroarray'e) oraz 32°C (wzrost kompetycyjny)? Po drugie, brakuje kontroli dla działania samego IPTG jako induktora nadekspresji sRNA (pWektor+IPTG).

Alternatywnie, jeśli pScr przyjmujemy jako kontrolę to wyniki dla pWektor są zbędne. Próby pobierano w takich samych punktach czasowych. Jednak przy różnej szybkości wzrostu (inne OD w danym czasie) dla niektórych szczepów transformowanych pGraL i pScr (oraz obecności IPTG), może to fałszować wyniki pomiaru aktywności z dwóch powodów. Po pierwsze różna ilość biomasy, a co za tym idzie różna ilość β -galaktozydazy w próbce nawet przy tym samym poziomie ekspresji w danych warunkach. Po drugie, ekspresja zfuzjowanego genu może zależeć od gęstości hodowli (efekt quorum-sensing), co może rzutować na mierzoną aktywność. Ponadto, aktywność mierzona w jednostkach własnych najprawdopodobniej nie uwzględnia różnic w ilości pobieranego materiału (biomasy) w poszczególnych krokach czasowych. Zatem wydaje się, że będzie pozornie rosła nawet w przypadku braku wzrostu ekspresji genów reporterowych. Porównywalnym parametrem będzie tu raczej aktywność specyficzna, która jest ilorazem aktywności w jednostkach własnych i OD hodowli, który jest parametrem proporcjonalnym do biomasy. Jak wyglądałyby wyniki przedstawione na wykresach 10 i 11 gdyby przedstawić je jako aktywność specyficzna od czasu hodowli? W końcu, przedstawiono tu wyniki dla jednego eksperymentu bez powtórzenia, co w przypadku niewielkich różnic uniemożliwia wyciągnięcie wiarygodnych wniosków co do wpływu GraL na ekspresję badanych genów. Co ciekawe, Doktorant jest dużo ostrożniejszy w wyciąganiu wniosków o regulatorowej roli GraL w przypadku pracy opublikowanej w Acta Biochimica Polonica niż w niniejszej rozprawie doktorskiej, a przecież konkluzje oparte są o te same wyniki doświadczalne. Rzeczywiście, wydaje się, że spośród badanych, ewentualna regulatorowa aktywność GraL dotyczy jedynie genu *nudE* (w wersji wielokopijnej) i to w szczepie ppGpp⁰ (aczkolwiek dane zaprezentowane na rysunku 12 E są nieczytelne dla logarytmicznej fazy wzrostu). Aby to zweryfikować Doktorant przeprowadza dodatkowe eksperymenty, które choć wykonane bez powtórzeń, konsekwentnie i spójnie wskazują, że raczej *greA*, w trakcie ekspresji którego powstaje GraL niż GraL samo w sobie jest odpowiedzialny wpływ na ekspresję *nudE*.

W drugiej części wyników zaprezentowano efekty badania wpływu nadprodukcji białka GreA oraz GraL na poziom ekspresji genu *greA*. Zastosowano tu fuzje reporterowe rejonu promotora oraz sekwencji liderowej *greA* z genem *lacZ*. Poprzez nadprodukcję GreA z konstruktu pod promotorem indukowanym IPTG wykazano autoregulację przez białko GreA wskazując jednocześnie, że sekwencja GraL (na poziomie DNA) jest niezbędna i wystarczająca do utrzymania tej autoregulacji, natomiast sekwencja rejonu promotora nie ma tutaj znaczenia. Ponadto, podobne wyniki zaobserwowano pomimo delecji *hfq*. Dodatkowych wyników dostarczyło tu badanie (za pomocą Northern blot) poziomu GraL w zależności od fazy wzrostu bakterii i obecności genu *greA*. Wykazano, że białko GreA jest niezbędne do prawidłowej syntezy GraL i może być dostarczone *in trans*. Co istotne badania te zostały przeprowadzone w powtórzeniach a wyniki zaprezentowane jako średnia z zaznaczeniem

słupków błędów (rysunki 25 i 26). Ostatnia porcja wyników w tej części odnosi się do badania wpływu terminatora transkrypcji GraL oraz samej sekwencji tego sRNA na autoregulację genu *greA*. Stosując fuzje reporterowe z *lacZ* sekwencji natywnej GraL oraz wersji „przetasowanej” wykazano, że zarówno sekwencja terminatora jak i GraL mają wpływ na wspomnianą autoregulację. Przy czym efekt ten jest widoczny najwyraźniej w logarytmicznej fazie wzrostu. Wyniki otrzymane w tej części pracy są spójne i jednoznaczne, pomimo podobnych uchybień dotyczących pomiarów aktywności β -galaktozydazy, które sygnalizowano dla wyników z pierwszej części. Należy też podkreślić, że w mojej opinii, wnioski dotyczące roli GraL na autoregulację genu *greA* dotyczą sekwencji GraL na poziomie DNA a nie RNA, zatem regulacyjna rola GraL nie wynika tu z fizycznej obecności tej cząsteczki jako sRNA. Chętnie usłyszałbym opinię Doktoranta na ten temat.


Ostatnia część rozdziału „Wyniki” przedstawia rezultaty badań nad wpływem dodatkowych czynników na regulację ekspresji genu *greA*. Badania te rozszerzają i uzupełniają dotychczas uzyskane wyniki i są próbą odpowiedzi na pytanie o mechanizm autoregulacji *greA*. W zastosowanym układzie eksperymentalnym nie zaobserwowano wpływu nadprodukcji białek Nus na terminację w rejonie liderowym *greA*. Wydaje się też, że białko CRP nie ma bezpośredniego wpływu poprzez sekwencje liderową *greA* a raczej oddziałuje z promotorem. Ponadto spowolniony wzrost szczepów z delecją *crp* może generować fałszywie pozytywny wynik z powodów wspomnianej nierównej ilości biomasy użytej to pomiarów aktywności β -galaktozydazy. W kolejnym eksperymencie Doktorant bada wpływ alternatywnej podjednostki σE (RpoE) na ekspresję różnych wariantów *greA-lacZ*, i w oparciu o wyniki sugeruje, że nadprodukcja źle sfałdowanego peptydu YYF (aktywującego poprzez wywołany stres błonowy σE) może wpływać na promotor P2 genu *greA*. Szkoda że nie przeprowadzono tutaj analizy statystycznej w oparciu o wyliczone średnie aktywności specyficzne aby wzmocnić (lub ewentualnie odrzucić) powyższe sugestie. Zwracam też uwagę, że Doktorant pozwolił sobie na niepoprawny opis wyników zilustrowanych na rysunku 32D (cyt. „zaobserwowano niewielki wzrost aktywności β -galaktozydazy w szczepie niosącym pBAI66, po dodaniu IPTG (przy OD600 ~2, 600 j.a. kontra 500 j.a. w szczepie z hodowli bez IPTG)”) w oparciu nieuprawnioną w moim przekonaniu ekstrapolację. Ostatnia część przedstawia wyniki przeprowadzonego na szeroką skalę poszukiwania czynników regulujących ekspresję genu *greA* wykonaną z zastosowaniem losowych bibliotek transpozonowych. Do tworzenia bibliotek użyto szczepów *E. coli* z dwoma wariantami *greA-lacZ* co pozwoliło na rozróżnienie, które z identyfikowanych genów mają wpływ na promotor genu *greA* a które na jego sekwencję liderową (zawierającą sekwencję GraL). W wyniku przeszukiwania ponad 4000 kolonii (które stanowiły tylko niewielką część biblioteki) udało się zidentyfikować kilkanaście genów, których uszkodzenie powoduje zmiany ekspresji β -galaktozydazy, co następnie zostało omówione dokładniej w Dyskusji.

Rozdział „Dyskują” również podzielony jest na trzy części odpowiadające głównym podrozdziałom „Wyników”. Doktorant rozwija tu interpretacje otrzymanych wyników odnosząc je do istniejącej wiedzy w tym temacie oraz wyjaśnia przyczyny niektórych negatywnych lub bezkonkluzywnych wyników. Zwraca uwagę na złożoność i wielopoziomowość mechanizmów regulujących ekspresję genów. Do warte podkreślenia w kilku miejscach wskazuje również kierunki dalszych badań co świadczy o mocnym zaangażowaniu w tematykę badań, dogłębnym przemyśleniu wyników a w konsekwencji o dojrzałości naukowej Doktoranta. W tej części pracy skomentowano również wyniki uzyskane z wykorzystaniem losowych bibliotek transpozonowych. Zaskakujące dla mnie jest zaskoczenie Doktoranta, że otrzymał spójne pokrywające się wyniki (cyt. „Co zaskakujące, pomimo że przeprowadzono dwa niezależne badania w szczepach zawierających dwie różne fuzje, wiele genów spełniających podobne funkcje zostało zidentyfikowane w obu szczepach”), wszak zastosowane fuzje były zazębiające się a nie zupełnie odmienne (por. Rys 20 B i D). Ciekaw też jestem opinii Doktoranta na temat wpływu uszkodzenia genów przez transpozon na utratę możliwości transkrypcji zlokalizowanych w pobliżu sRNA jako efektu wyjaśniającego zaangażowanie uszkodzonych genów w regulację ekspresji *greA*, kodującego czynnik transkrypcyjny. Choć praca dotyczy tej tematyki ten aspekt został w tej części dyskusji pominięty.

Pod względem językowym i edytorskim praca jest poprawna. Rysunki i tabele są czytelne i dobrze opisane, mają też swoje odnośniki w tekście. Z obowiązku recenzenta wymieniam kilka niefortunnych sformułowań wynikających głównie z tłumaczenia z języka angielskiego, np. dysrupcja struktury drugorzędowej (str.25), postój polimerazy RNA może spowodować cofanie się polimerazy...(str.30), bakterie odmładzano (str.51), hodowle bakteryjne hodowano...(str. 52), system utylizacji glicyny (str.108), fitness komórek (str. 109), wiele genów represjonowanych przez..., gdzie wydelegowano fur (str. 113).

Pomimo pewnych uwag krytycznych dotyczących w szczególności pierwszej części zaprezentowanych wyników i ich interpretacji w niniejszej pracy uważam, że jako całość praca jest poprawnym opracowaniem bardzo ciekawego zagadnienia naukowego dotyczącego regulacji ekspresji genów przez sRNA. Podczas badań Doktorant posługiwał się wieloma zaawansowanymi technikami z dziedziny biologii molekularnej i stworzył znaczącą ilość materiałów które mogą być wykorzystane do dalszych badań. Uzyskane wyniki są oryginalne i wnoszą nowe informacje dotyczące roli GraL w ekspresję genów oraz mechanizmów i czynników wpływających na regulację ekspresji genu *greA*. Uważam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wymagania stawiane w stosownych przepisach prawa (art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami)), dlatego wnoszę

do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr Macieja Dylewskiego
do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maciej Dylewski', written in a cursive style.