



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
dr hab. Agnieszka Kwiatek
e-mail: a.kwiatek2@uw.edu.pl



Warszawa, 20.06.2023

Recenzja pracy doktorskiej
Mgr Aleksandry Wiśniewskiej

Molekularny mechanizm krzyżowego działania dwóch czynników transkrypcyjnych: białka C systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I oraz represora RacR defektywnego faga *Escherichia coli*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Wiśniewskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Iwony Mruk, prof. UG, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego i przedłożona Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Praca napisana jest w języku polskim i ma formę klasycznej zwartej rozprawy.

Rozprawa doktorska liczy 111 stron i ma typowy dla tego typu dysertacji układ z podziałem na następujące rozdziały, Wykaz skrótów, Streszczenia w języku polskim i języku angielskim, Wstęp, Cel, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Literatura. W pracy Doktorantka zamieściła 49 rycin i 7 tabel, 38 rycin przedstawia uzyskane wyniki. Pozostałe ryciny umieszczone są w rozdziałach Wstęp oraz Dyskusja.

Tytuł pracy jest skonstruowany poprawnie i odpowiada treści pracy.

We Wstępie mgr Aleksandra Wiśniewska dokładnie opisała bakteryjne czynniki transkrypcyjne oraz regulację transkrypcji. Doktorantka przedstawiła również krótką charakterystykę systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (RM), uwzględniając system RM Csp231I *Citrobacter* sp. RFL 231. System RM Csp231I zawiera 3 białka: endonukleazę restrykcyjną, metylotransferazę DNA oraz regulatorowe białko C.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Dotychczas, zespół prof. I. Mruk wykazał m.in. powstawanie wydłużonych komórek *Escherichia coli* po wprowadzeniu do nich genów systemu RM Csp231I.

Celem rozprawy doktorskiej mgr A. Wiśniewskiej było zbadanie molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie zaobserwowanego fenotypu wydłużonych komórek *E. coli* niosących geny systemu RM Csp231I. Główny cel pracy został sformułowany w sposób jednoznaczny i zrozumiały. Cele szczegółowe dotyczyły poszczególnych etapów pracy.

Dobór oraz celowość zastosowanych metod nie budzi zastrzeżeń. Mnogość opisanych technik badawczych świadczy o dobrym przygotowaniu metodologicznym i biegłości w technikach z zakresu biologii molekularnej i mikrobiologii. Metody opisane są w sposób bardzo dokładny, co umożliwia odtworzenie poszczególnych eksperymentów. Niemniej jednak, niektóre metody rutynowo stosowane w biologii molekularnej, np. elektroforeza agarozowa DNA, trawienie enzymami restrykcyjnymi, przygotowanie żelu poliakrylamidowego nie musiały być opisane ze szczegółami dotyczącymi, np. wylewania żeli.

Podjęcie eksperymentalne, wykorzystane do realizacji zaplanowanych celów pracy było przemyślane. Przebieg prowadzonych badań jest uporządkowany i oparty o logiczną interpretację wyników. Wnioskowanie zostało bardzo dokładnie opisane.

Aby zrealizować postawiony główny cel badań, Doktorantka skupiła się na molekularnym mechanizmie krzyżowego działania czynników transkrypcyjnych: białka C pochodzącego z systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I *Citrobacter* sp. oraz z represora RacR bakteriofaga *E. coli*.

Pierwszy, z opisanych przez Doktorantkę, wyników dotyczy identyfikacji elementów genetycznych systemu RM Csp231I odpowiedzialnych za filamentację komórek *E. coli*. Mgr A. Wiśniewska wykazała, że powstawanie filamentów komórkowych jest skorelowane z obecnością aktywnego białka C systemu RM Csp231I, a nie z aktywnością restrykcyjną tego systemu. Powstawanie filamentów nie jest także zależne od kompleksu RecA, co sugeruje, że może być związane z innym zjawiskiem niż komórkowa odpowiedź SOS. Czy zbadano korelację z aktywnością modyfikującą tego systemu?

Aby zidentyfikować geny zaangażowane w proces filamentacji, przeprowadzono globalną analizę transkryptomu komórek *E. coli* niosących geny systemu RM Csp231I. Analiza różnicowa wykazała, że białko C bierze udział w regulacji transkrypcji w regulonie *E. coli* w obrębie profaga kryptycznego Rac. Wśród genów o zmienionej ekspresji, ekspresja jednego genu, genu *racR* była obniżona. Gen *racR*, kodujący prawdopodobnie czynnik transkrypcyjny, poprzedza region intergenowy oraz operon *ydaST*.

Przeprowadzając wiele szczegółowych analiz, Doktorantka wykazała, że białko C wiąże się do sekwencji C-box w obrębie swojego promotora oraz do sekwencji *racR* w rejonie profaga Rac genomu *E. coli* K-12 MG1655. Białko C wiąże się do też do innej sekwencji, która to sekwencja jest miejscem wiązania się białka RacR i represora genów *ydaA* i *ydaT*. Wiązanie białka C skutkuje zakłóceniem funkcjonowania regulonu RacR powodując spadek ekspresji genu *racR* i w konsekwencji derepresję *ydaA* i *ydaT*. Uzyskane przez mgr A. Wiśniewską wyniki wskazują, że aktywność białek YdaS i YdaT prowadzi do powstawania filamentów komórkowych i jest związane prawdopodobnie z zaburzeniem podziałów komórkowych i segregacji komórek potomnych. Dodatkowo, Doktorantka wykazała, że ekspresja białka C zmniejsza żywotność komórek *E. coli* MG1655. Podłoże molekularne tego zjawiska należy zbadać w przyszłości.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka omówiła znaczenie biologiczne uzyskanych doświadczeń *in vitro*. Dodatkowo, porównując region *racR-ydaST* do regionu genomu bakteriofaga λ odpowiedzialnego za wejście faga w cykl lityczny lub lizogeny, Doktorantka wskazała na potencjalne funkcje białek YdaS i YdaT.

Bardzo cenny jest również rozdział Podsumowanie, w którym Doktorantka w skondensowany sposób zaprezentowała swoje najważniejsze wyniki i osiągnięcia badawcze.

Podsumowując, mgr A. Wiśniewska wykazała, że czynniki transkrypcyjne nabyte drogą horyzontalnego transferu genów mogą modulować ekspresję genów gospodarza. Wnikający do komórek „obcy” DNA, jeżeli koduje gen regulatora może zakłócać sieć regulatorową gospodarza. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na rolę systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych wykraczającą poza funkcję obroną przed „obcym” DNA.

Część wyników zawarta jest w publikacji “Transcriptome analyses of cells carrying the Type II Csp231I restriction-modification system reveal cross-talk between two unrelated transcription factors: C protein and the Rac prophage repressor” opublikowanej w 2019 r w renomowanym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Pozostała część wyników, zaprezentowana w pracy doktorskiej, zostanie opublikowana w najbliższym czasie w renomowanych czasopismach naukowych.

Pytania i zagadnienia do dyskusji.

1. W streszczeniu Doktorantka stwierdziła: „Nie jest jasne czy te zjawiska są przypadkowe”. Moje pytanie brzmi, jeżeli nie są przypadkowe, to jaka może być przyczyna zaobserwowanych zmian?
2. Dlaczego używane były różne stężenia białek C i RacR (Metody, pkt. 4.21)?
3. Czy wyniki RNA-Seq były potwierdzone metodą RT-qPCR?

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

4. Czy w eksperymentach dotyczących żywotności komórek badany był również szczep z komplementacją wprowadzonych mutacji?
5. Dlaczego zastosowano szczep *E. coli* BL21(DE3), a nie ER2566? Ryc. 36 sugeruje, że większą nadprodukcję białka uzyskano w szczepie *E. coli* ER2566.
6. Do niektórych danych nie przedstawiono analizy statystycznej. Szczególnie dotyczy to wyników prezentowanych na Ryc. 17, 26, 29 oraz ryciny przedstawionej na str. 71.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na niedociągnięcia edytorskie i redakcyjne. Przede wszystkim w Materiałach i Metodach powinny być podawane stężenia, a nie objętości. W wynikach na str. 60 Doktorantka użyła takiego zdania „Hodowle bakteryjne w LB w fazie logarytmicznej indukowałam arabinozą”. Jest to slang laboratoryjny. Dlaczego na stronie 65 użyto słowa „tendencja”? Co to znaczy „na końcu eksperymentu”? Jak określano liczbę pokoleń? Na str. 73 Doktorantka użyła stwierdzenia „Wydaje się z literatury”. Doktorantka używa również określenia „prążki” wskazując fragmenty DNA lub białka. Co znaczy „Pobieżna analiza sekwencji DNA” (str. 86)?. Do ryciny przedstawionej na stronie 71 nie zamieszczono opisu. W pracy Doktorantka używała różnego typu czcionek.

Pomimo moich uwag dotyczących strony redakcyjnej pracy, uważam, że otrzymane wyniki niosą istotne wartości poznawcze, a ich wartość przeważa nad niedociągnięciami redakcyjnymi.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca zawiera wyniki wnoszące oryginalny wkład w dziedzinę. Część wyników została już opublikowana w recenzowanym czasopiśmie naukowym. W związku z tym rozprawa spełnia wymagania dotyczące nadawania stopnia doktora określone w art. 186 pkt 1 ust. 1-5 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.

Dlatego też, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Wiśniewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

