



dr hab. Mikołaj Olejniczak, prof. UAM

Pracownia Biochemii RNA

17 czerwca 2021, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Moniki Rezulak zatytułowanej
„Rola wyspecjalizowanego białka kontrolującego w regulacji ekspresji
systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I z *Citrobacter sp.* RFL231”

Praca doktorska Pani mgr Moniki Rezulak została wykonana pod opieką Pani prof. UG dr hab. Iwony Mruk w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka pracy dotyczy mechanizmów regulacji systemów restrykcji-modyfikacji, które uczestniczą w kontroli wprowadzania obcego DNA do komórek bakteryjnych. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała metody biologii molekularnej, biochemii oraz bioinformatyki, aby wyjaśnić złożony mechanizm regulacji systemu restrykcji-modyfikacji, w którym uczestniczy białko C oraz antysensowe RNA wspólnie kontrolujące względny poziom ekspresji poszczególnych komponentów tego systemu niezbędny dla utrzymania równowagi pomiędzy aktywnościami restrykcji i modyfikacji.

Wstęp literaturowy pracy bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze sposobem działania systemów restrykcji-modyfikacji oraz z ich regulacją. Wyjaśnienie tych zagadnień nie jest łatwe, ponieważ systemy te nie są regulowane w sposób „zero-jedynkowy”, lecz w sposób ilościowy, gdzie bardzo ważna jest odpowiednia równowaga pomiędzy stężeniami różnych komponentów systemu w komórce oraz w różnych fazach wprowadzania systemu do komórki. Doktorantka bardzo logicznie i klarownie przedstawiła funkcję biologiczną i specyfikę działania systemów restrykcji-modyfikacji. Ponadto porównała te systemy z koncepcyjnie podobnymi systemami toksyna-antytoksyna. Jest to bardzo istotny aspekt działania obu typów systemów obronnych bakterii.

Poza przedstawieniem ogólnych zasad działania systemów restrykcji-modyfikacji bardzo przydatne dla czytelnika było także opisanie szczególnie charakterystycznych



przykładów regulacji tych systemów, w tym także z udziałem dodatkowych czynników. W szczególności wyjaśnienie znanych mechanizmów regulacji związanych z udziałem białek C oraz antysensowych RNA, a także regulacji z zastosowaniem różnej liczby i orientacji promotorów odpowiedzialnych za transkrypcję genów poszczególnych składników systemu było pomocnym odniesieniem dla aspektów podjętych przez Doktorantkę w części eksperymentalnej rozprawy.

Po to aby wyjaśnić mechanizm działania białka C z systemu restrykcji-modyfikacji Csp231I w bakteriach *Citrobacter* Doktorantka w pierwszej kolejności przeprowadziła analizę bioinformatyczną sekwencji podobnych systemów, aby wskazać regiony zakonserwowane wśród nich. Pozwoliło jej to na porównanie regionów najsilniej zakonserwowanych ewolucyjnie pomiędzy systemami podobnymi do Csp231I, a należącymi do dobrze poznanego systemu PvuII, również zawierającego białko C. Dzięki temu porównaniu mogła wskazać sekwencje aminokwasowe białka C z Csp231I, które mogły być zaproponowane jako występujące w regionach zaangażowanych w oddziaływanie z polimerazą RNA (czynnik σ^{70}) (sekwencja SQE) oraz w wiązanie sekwencji C-box w DNA (R34). Porównanie wiązania oczyszczonego białka C z Csp231I oraz jego mutantów zawierających substytucje reszt aminokwasowych w sekwencji SQE albo w sekwencji ARQ zawierającej argininę 34 do cząsteczki DNA zawierającej sekwencję C-box pokazało, że mutacje obu tych sekwencji pozbawiają białko C zdolności do oddziaływania z DNA.

W kolejnym etapie badań Pani mgr Monika Rezulak scharakteryzowała aktywność transkrypcyjną zidentyfikowanych sekwencji promotorowych systemu Csp231I oraz wykorzystanie obu obecnych w tym systemie sekwencji operatorowych C-box przez białko regulatorowe C. Doktorantka wykazała, że w systemie reporterowym białko C kontroluje transkrypcję z promotorów własnego genu oraz genu metylotransferazy, natomiast nie kontroluje obu promotorów genu restryktazy. Dokładniejsze analizy wykazały, że w niższych stężeniach białko C wykazuje funkcję aktywatora transkrypcji własnego genu, a w wyższych represora, przy czym dominuje funkcja represora. Ponadto Doktorantka wykazała, że gen restryktazy może ulegać ekspresji zarówno jako osobny transkrypt, którego promotor nie jest zależny od białka C, jak również jako transkrypt bicistronowy wspólnie z genem białka C. Konsekwencją tego



faktu jest mniejszy wpływ białka C na transkrypcję restryktazy w systemie Csp231I, niż w dobrze poznanym systemie PvuII. Badania wprowadzania systemu Csp231I do komórek bakteryjnych wykazały rolę białka C w obniżaniu aktywności restryktazy, co jest spójne z zaproponowaną rolą tego białka w represji transkrypcji tego genu.

W drugiej części wyników Pani mgr Monika Rezulak podążyła ścieżką badawczą, która rozpoczęła się od niespodziewanej obserwacji, że konstrukt reporterowy zawierający pełnej długości sekwencję genu białka C mniej wydajnie ulega ekspresji niż konstrukt zawierający jedynie 5'-końcowy fragment tego genu. Analiza aktywności transkrypcyjnej pełnej długości tego genu, m.in. za pomocą RNA-seq, wykazała, że na komplementarnej nici DNA znajduje się gen transkryptu antysensowego względem mRNA białka C. Dalsze badania wykazały, że inaktywacja promotora transkryptu antysensowego, prowadzi do wzrostu ekspresji mRNA białka C oraz, co ciekawe, stabilizacji transkryptu mRNA genu restryktazy. Analizując sekwencje badanego systemu Doktorantka odkryła, że w obrębie sekwencji mRNA białka C znajduje się region komplementarny do sekwencji antysensowej względem regionu liderowego mRNA restryktazy. Z zastosowaniem dokładnej analizy ekspresji poszczególnych genów zależnie od mutacji poszczególnych elementów regulatorowych Doktorantka zaproponowała przekonujący mechanizm kontroli systemu restrykcji-modyfikacji Csp231I, w którym mRNA białka C poza funkcją w translacji spełnia też rolę cząsteczki regulatorowej, która wiążąc się z RNA antysensowym względem sekwencji liderowej mRNA restryktazy ogranicza represję tego ostatniego mRNA.

Z pytań, o których wyjaśnienie prosiłbym Doktorantkę podczas obrony pierwszym jest pytanie, jaka była przyczyna wybrania właśnie systemu Csp231I z bakterii *Citrobacter* do badań? Drzewo filogenetyczne białek C na rysunku 14 pokazuje bardzo liczną rodzinę tych białek, dlatego ciekawe jest co spowodowało podjęcie analizy tego systemu spośród wielu innych.

Drugie pytanie dotyczy mutantów białka C, które nie oddziałują z DNA. Czy wprowadzenie mniej rozległych mutacji, np. tylko Q17A lub R34A mogłoby lepiej posłużyć do rozróżnienia obu regionów? Zapewne oczekivalibyśmy mniejszy udział sekwencji SEQ w wiązaniu DNA, niż sekwencji ARQ? Z tą samą kwestią związane jest pytanie, czy znany jest sposób potwierdzenia aktywności tych białek? Na przykład czy



dimeryzacja jest konieczna dla działania tych białek? Jeśli tak, to brak dimeryzacji mutantów może sugerować, że przyczyną ich nie wiązania się do DNA może być raczej większa zmiana konformacyjna, a nie tylko brak możliwości utworzenia oddziaływań pomiędzy resztami aminokwasowymi w tych sekwencjach a DNA.

Z drobiazgowych stylistycznych w pracy, powszechnie przyjęty termin to RNA „antysensowy”, a nie „antysensowny”, oraz końce kwasów nukleinowych powinno się oznaczać symbolem prim, a nie apostrofem.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Monika Rezulak zawiera bardzo interesujące wyniki dotyczące nowego mechanizmu regulacji systemu restrykcji-modyfikacji, w którym znaczącą rolę odgrywają oddziaływania pomiędzy komplementarnymi regionami mRNA białka regulatorowego oraz dwóch antysensowych RNA. Doktorantka konsekwentnie prowadzi czytelnika przez kolejne etapy procesu badawczego, w którym otrzymane wyniki służą do postawienia nowych interesujących pytań. Z rozprawy wynika, że w swojej pracy Doktorantka nie próbowała narzucić sobie celu do udowodnienia, lecz raczej podążała za odkryciami, co pozwoliło Jej zachować otwartą głowę dla dostrzegania i doceniania niespodziewanych odkryć. Jest to oczywiście najlepszy sposób prowadzenia badań naukowych, a poza tym przekłada się na bardzo interesująco, klarownie i logicznie napisaną rozprawę doktorską. Warto podkreślić, że część wyników pracy została opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* w publikacji, w której Doktorantka jest pierwszą autorką.

Przedstawiona mi do oceny praca Pani mgr Moniki Rezulak spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie Pani mgr Monice Rezulak stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia. Ponadto, ze względu na bardzo wysoką wartość naukową wyników pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Mikołaj Olejniczak