



UNIwersytet
Warszawski

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



Warszawa, 22.06.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Dawida Kościelniaka, pt.

„Nieprogramowany poślizg transkrypcji: analiza porównawcza bakteryjnej (*Escherichia coli*) i bakteriofagowej (T7) polimerazy RNA”

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

Proces transkrypcji odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów. Poznano liczne mechanizmy, głównie operujące na poziomie inicjacji tego procesu, które warunkują syntezę cząsteczek RNA i białek – zachodzącą z odpowiednią dynamiką i we właściwym czasie, w zależności od działania różnych bodźców pochodzenia endo- lub egzogenego. Również sam przebieg transkrypcji, głównie w obrębie sekwencji homopolimerycznych, może mieć istotne znaczenie regulacyjne ze względu na możliwy poślizg polimerazy RNA, który prowadzi do generowania puli zmienionych transkryptów, zawierających insercje lub delecje. Badania nad tym zjawiskiem koncentrowały się głównie na przypadkach programowego poślizgu transkrypcji, do którego dochodzi w obrębie ściśle określonych miejsc w sekwencji. Zdarzenia takie mogą m.in. przywracać funkcje zmutowanych genów, co w przypadku genów metabolizmu podstawowego decyduje o przebiegu podstawowych funkcji życiowych, a w odniesieniu do genów transpozaz, stanowi czynnik regulujący częstość transpozycji niektórych transpozonów. Znaczenie biologiczne tego typu zmian jest zatem bardzo duże, lecz wciąż pozostaje niedoszacowane.

Znacznie mniej wiadomo na temat nieprogramowanego poślizgu transkrypcji, mimo iż zakres tego zjawiska, wynikający z powszechności występowania sekwencji homopolimerycznych w genomach bakterii, wydaje się być znacznie większy. Badanie tego typu zdarzeń nie jest proste i wymaga opracowania i zastosowania odpowiednich modeli eksperymentalnych, pozwalających na monitorowanie zmian zachodzących spontanicznie w sekwencji

transkryptów. Tym bardziej należy docenić wysiłek Doktoranta, który podjął się w swojej pracy niełatwego zadania, jakim była analiza nieprogramowanego poślizgu transkrypcji, zachodzącego z udziałem różnych polimeraz RNA – wielopodjednostkowej bakteryjnej polimerazy *Escherichia coli* oraz jednopodjednostkowej polimerazy bakteriofaga T7. Wykorzystanie polimeraz o odmiennej strukturze, właściwościach i procesywności dostarczyło ciekawych danych porównawczych, co stanowi istotną wartość rozprawy.

Pan mgr Dawid Kościelniak przygotował rozprawę w formie klasycznego, spójnego tematycznie opracowania. To dość obszerne dzieło, liczące 215 stron, zawiera rozdziały typowe dla prac o charakterze eksperymentalnym, tj. *Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Streszczenie* (w języku polskim i angielskim) oraz *Piśmiennictwo*. W mojej opinii *Streszczenie* powinno rozpoczynać rozprawę, wówczas jego lektura już na wstępie daje czytelnikowi ogólne wyobrażenie o zakresie przeprowadzonych prac. Zamieszczenie tego rozdziału na końcu pracy, po *Dyskusji i Podsumowaniu*, powoduje, że jest on odbierany jedynie jako powtórzenie poznanych wcześniej treści. W pracy zamieszczono także *Wykaz stosowanych skrótów* (choć wymienione są tam również skrótowce) oraz *Suplement* zawierający informacje na temat rozmieszczenia sekwencji homopolimerycznych w genomach *E. coli* i bakteriofaga T7, a także szczegółowe dane na temat polimorfizmu transkryptów powstających w wyniku poślizgu transkrypcji w zastosowanym w pracy układzie reporterowym.

Rozprawa została przygotowana starannie. Drobne niedociągnięcia, błędy językowe czy niezręczne sformułowania są nieliczne i nie wpływają na pozytywny odbiór całości. Należy również podkreślić dużą dbałość o szatę graficzną rozprawy – zamieszczono w niej przemyślane i odpowiednio opisane ryciny podsumowujące wyniki kolejnych etapów części eksperymentalnej. Z obowiązku recenzenta wspomnę jedynie, że na Ryc. 43 słabo widoczny jest obraz fluorescencji komórek po ekspresji genów fuzyjnych. Zapytam też jakie są reguły stosowania kodu dwu lub trzyliterowy przy oznaczaniu fenotypów oporności na antybiotyki – w pracy pojawiają się obie formy w odniesieniu do fenotypów determinowanych przez plazmidy? Zwrócę także uwagę na brak konsekwencji Autora w stosowaniu skrótu w pisowni nazwy bakterii *Escherichia coli*.

Wstęp pracy jest klarowny a zawarte w nim informacje są wystarczające dla zrozumienia dalszych części rozprawy. W kolejnych rozdziałach zawarto, kolejno, krótkie wprowadzenie na temat klasyfikacji polimeraz RNA, opis poszczególnych etapów transkrypcji zachodzących z udziałem analizowanych w tej pracy polimeraz, a w końcowej części scharakteryzowano błędy jakie powstają podczas procesu transkrypcji. Informacje te przedstawiono na tle aktualnych danych literaturowych. Ostatnia część *Wstępu*, zestawiająca dane na temat „niedoskonałości”

przebiegu transkrypcji oraz biologicznego znaczenia tego zjawiska była dla mnie szczególnie interesująca; podkreśla ona także istotność podjętej tematyki badawczej. Treści te są bezpośrednio związane z wątkiem przewodnim rozprawy i odpowiednio prowadzą czytelnika do postawionego celu naukowego, który został jednoznacznie i klarownie sformułowany.

Materiały i metody przedstawiono w dwóch oddzielnych rozdziałach. Zawierają one informacje (o zadowalającym stopniu szczegółowości) na temat sposobu przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów. Należy podkreślić, że badania wymagały zastosowania różnorodnych technik molekularnych oraz stworzenia bardzo dużej liczby zdefiniowanych pod względem genetycznym konstruktów plazmidowych, co dowodzi znakomitego warsztatu badawczego Doktoranta. Moje uwagi krytyczne do tej części pracy dotyczą jedynie zbyt ogólnie sformułowanych tytułów niektórych rozdziałów, np. tytuł rozdziału 5.3. „*Indukcja hodowli bakteryjnej*” powinien brzmieć „*Indukcja ekspresji genów w hodowli bakteryjnej*”, w rozdziale 5.7.2. poprawną formą jest „Elektroforeza białek”, a nie „białkowa”, a w rozdziałach 5.12 i 5.14. należy sprecyzować, że podane metody dotyczą DNA (np. „Sekwencjonowanie DNA”).

Wyniki przedstawiono na 56 stronach rozprawy. Jako model badawczy Doktorant wykorzystał zmutowany gen metylotransferazy M.Mboll (z przedwczesnym kodonem STOP), w którym poślizg transkrypcji w obrębie sekwencji homopolimerycznych skutkowało powstaniem puli transkryptów typowych dla dzikiej wersji genu. Układ ten umożliwił porównanie efektywności poślizgu transkrypcji zachodzącego z udziałem różnych polimeraz RNA, bakteryjnej i wirusowej, a także pozwolił na zbadanie wpływu jaki wywiera na to zjawisko specyfika sekwencji homopolimerycznych oraz czynniki komórkowe zaangażowane w proces elongacji transkrypcji.

Ciekawą obserwacją, jaką poczynił Doktorant w pierwszym etapie badań, było stwierdzenie nieefektywnej ekspresji zmutowanego wariantu genu metylotransferazy, zachodzącej z udziałem bakteryjnej polimerazy RNA. Był to dość zaskakujący wynik, którego wyjaśnienie wymagało podjęcia dalszych działań. Wykorzystując odpowiednio skonstruowane układy badawcze Doktorant wykazał, że wprowadzeniu dodatkowego kodonu STOP w genie M.Mboll towarzyszy efekt polarności transkrypcji, który prowadzi do przedwczesnej terminacji tego procesu. Dowiódł również, że terminacja ta nie jest zależna od białka Rho, lecz wynika z niestabilności dystalnej części powstających transkryptów, będących preferencyjnym celem działania endorybonukleaz komórkowych. W kolejnych etapach tej części pracy Doktorant badał także wpływ innych czynników na efektywność poślizgu transkrypcji, biorąc pod uwagę m.in. (a) tempo syntezy mRNA (zastosował w tym przypadku zmutowany wariant polimerazy RNA faga T7 o zmniejszonej aktywności), (b) liczbę kopii genu reporterowego (co wymagało

m.in. wprowadzenia tego genu do chromosomu), a także (c) wpływ kompleksu antyterminacyjnego *nutL/N* bakteriofaga lambda. Wykorzystując metodę NGS określił także polimorfizm transkryptów generowanych przez polimerazę RNA *E. coli* w proksymalnej części delecyjnego wariantu genu reporterowego, co przyniosło wyniki wskazujące na preferencje poślizgu transkrypcji w obrębie niektórych sekwencji homopolimerycznych oraz na istotność otoczenia nukleotydowego homopolimerów.

To ostatnie zagadnienie, preferencji polimeraz RNA do poślizgu w obrębie określonych sekwencji, zostało rozwinięte i poddane kompleksowym analizom w drugiej części rozprawy. Doktorant skonstruował i wykorzystał do tego celu serię odpowiednio zaprojektowanych układów genetycznych – w formie fuzji translacyjnych sekwencji homopolimerycznych z genem reporterowym *gfp*, znajdujących się pod kontrolą różnych systemów ekspresyjnych. Badania te nie były łatwe do przeprowadzenia – wymagały odpowiedniej standaryzacji układów, uwzględniającej m.in. wpływ zmian wprowadzonych w sekwencji aminokwasowej na *N*-końcu Gfp na zdolności fluorescencyjne powstających wariantów tego białka.

Podsumowując *Wyniki* należy podkreślić, że opisane w tym rozdziale badania wymagały od Doktoranta bardzo dużego nakładu pracy, praktycznej znajomości wielu metod z zakresu genetyki i biologii molekularnej oraz szczegółowej wiedzy eksperckiej z zakresu biologii. Efektem przeprowadzonych badań są zarówno ogólne, jak i szczegółowe obserwacje, które w istotnym stopniu wzbogacają wiedzę na temat nieprogramowanego poślizgu transkrypcji. Wskazują one m.in. (a) na powszechność tego zjawiska, (b) na znaczące różnice w predyspozycji testowanych polimeraz do generowania zmian podczas transkrypcji, a także różnice w preferencji insercji określonych nukleotydów podczas poślizgu transkrypcji, (c) na istotność właściwości sekwencji homopolimerycznych (długości sekwencji, rodzaju nukleotydów i ich kontekstu) w generowaniu i efektywności poślizgu transkrypcji, a także (d) na rolę efektu polarności transkrypcji w ograniczeniu skutków poślizgu zachodzącego z udziałem polimerazy RNA *E. coli*.

Uzyskane wyniki zostały rzeczowo omówione na tle aktualnej bibliografii w rozdziale *Dyskusja*. Rozdział ten przynosi również ciekawe zestawienie danych na temat dystrybucji i rozmieszczenia sekwencji homopolimerycznych w genomach *E. coli* i bakteriofaga T7, co stanowi przyczynek do rozważań na temat potencjalnych skutków poślizgu transkrypcji w znacznie szerszym, ogólnokomórkowym zakresie. Rozprawę kończy rozdział *Podsumowanie*, który punktuje najważniejsze osiągnięcia rozprawy.

Dyskusja została dobrze poprowadzona. W rozdziale tym znalazłem odpowiedzi na kilka pytań, które pojawiły się w trakcie lektury rozprawy. Chętnie poznam jednak zdanie Doktoranta, na

ile prawdopodobny jest podwójny poślizg transkrypcji w różnych homopolimerach pojedynczego genu (np. kolejno +1 i -1) – zjawisko takie mogłoby potencjalnie skutkować powstaniem puli białek o stosunkowo niewielkich (lecz istotnych) zmianach w sekwencji. Naturalne układy genetyczne są dużo bardziej złożone niż układy eksperymentalne. Jaki wpływ na omawiane w pracy zjawisko może wywierać interferencja transkrypcji w wyniku aktywności dywergentnie skierowanych promotorów?

W końcowej części recenzji chciałbym podkreślić, że rozprawę Pana mgr. Dawida Kościelniaka oceniam bardzo wysoko. Doktorant podjął się rozwiązania oryginalnego problemu naukowego, wykorzystując do tego celu odpowiednio dobrane metody i techniki molekularne. Nie ulega dla mnie wątpliwości, że w pełni posiadał on umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Dzięki logicznie zaprojektowanym eksperymentom, zastosowaniu właściwych kontroli oraz wnikliwej i krytycznej analizie uzyskanych wyników, Doktorant udokumentował wiele rzetelnych i wartościowych obserwacji na temat poślizgu transkrypcji – zjawiska, które ze względu na jego zakres oraz możliwość generowania licznych subpopulacji mRNA, może odgrywać istotną rolę w regulacji ekspresji genów, a także wpływać na generowanie białek o nowych właściwościach. W tym miejscu należy zaznaczyć, że znaczna część wyników ocenianej rozprawy została już opublikowana, w 2018 roku, w uznanym periodyku *Microbial Cell Factories* (IF 4,4) – zyskała więc już wcześniej pozytywne opinie specjalistów i edytorów naukowych.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana praca w pełni spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim, dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr. Dawida Kościelniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową zgromadzonych wyników oraz zakres przeprowadzonych badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik

