

prof. dr hab. Dariusz Bartosik
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1
02-096 Warszawa



Warszawa, 25.01.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamili Rachwał
pt. Białko RosR jako globalny regulator ekspresji genów *Rhizobium
leguminosarum* bv. trifolii 24.2**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa została wykonana w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem dr hab. Moniki Janczarek, prof. UMCS. Jak wynika z tytułu rozprawy, organizmem modelowym w badaniach była bakteria z grupy ryzobiów – *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. Powszechnie wiadomo, że ryzobia mogą nawiązywać relacje symbiotyczne z roślinami bobowatymi, w trakcie których nabywają zdolność do biologicznego wiązania azotu. Bakterie te odgrywają zatem istotną rolę w obiegu azotu w biosferze, wzbogacając przy tym glebę w składniki odżywcze, niezbędne do wzrostu roślin, co czyni je ciekawym modelem badawczym – zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Ryzobia bytują w różnych środowiskach – w glebie, ryzosferze i brodawkach roślin. Dzięki dużej różnorodności metabolicznej są one w stanie szybko dostosowywać się do zmiennych warunków zasiedlanych nisz ekologicznych. Zmiany o charakterze adaptacyjnym są zwykle inicjowane na poziomie transkryptomu, wynikają bowiem z aktywacji bądź represji grup genów zaangażowanych w różne procesy metaboliczne. Zagadnieniem bardzo ważnym, lecz wciąż w niedostatecznym stopniu zbadanym, jest sposób funkcjonowania globalnych sieci regulacji ekspresji genów w różnych gatunkach/szczepach bakterii oraz identyfikacja sygnałów środowiskowych inicjujących zmiany w transkrypcji. Oceniana rozprawa wpisuje się w ten nurt tematyczny. Stawia ona za cel zbadanie regulonu *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, który znajduje się pod kontrolą globalnego regulatora transkrypcji RosR. Uzyskane wyniki ujawniły złożoność mechanizmów regulacyjnych tego regulonu oraz ich powiązanie z ekspresją puli genów o charakterze adaptacyjnym.

Ocena układu, zawartości i formalnej strony rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie dzieła. Ma ona klasyczny układ i jest podzielona na 11 rozdziałów, obejmujących m.in. Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Dyskusję, Wnioski i Literaturę. W rozprawie umieszczono 12 tabel i 47 rysunków, których spis przedstawiono w dwóch końcowych rozdziałach. Wstęp pracy, obejmujący 39 stron, stanowi kompendium wiedzy na temat biologii i mechanizmów adaptacji bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* do różnych środowisk bytowania, ze szczególnym naciskiem na relacje symbiotyczne tych mikroorganizmów z roślinami bobowatymi. Na początku tego rozdziału, w krótkim wprowadzeniu, Autorka charakteryzuje ryzobia, podkreślając ich zdolność do wiązania azotu atmosferycznego oraz zmienność struktury ich genomów. Kolejne rozdziały opisują (i) właściwości i biologiczną rolę polisacharydów powierzchniowych ryzobiów, (ii) mechanizmy warunkujące przystosowanie ryzobiów do życia w środowisku glebowym oraz w symbiozie z roślinami bobowatymi, a także (iii) podstawy samej symbiozy, w tym sygnały molekularne inicjujące nawiązanie relacji symbiotycznych. Na tym tyle, w ostatniej części Wstępu, przedstawiono charakterystykę ryzobiowych białek regulatorowych z rodziny RosR/MucR, pełniących funkcje globalnych regulatorów transkrypcji genów.

Wstęp jest kompletny i dobrze poprowadzony. Zawarte w nim informacje ułożone są w logiczny ciąg, zmierzający bezpośrednio do jednoznacznie postawionego celu naukowego, który osiągnięto poprzez realizację wyszczególnionych zadań badawczych.

W kolejnym rozdziale rozprawy opisano materiały wykorzystane w badaniach oraz metodykę prac eksperymentalnych. W tym miejscu należy podkreślić bogaty warsztat badawczy Doktorantki, obejmujący szeroki wachlarz technik z zakresu, mikrobiologii, genetyki, mikroskopii, transkryptomiki, proteomiki i bioinformatyki, a także technik umożliwiających wykonanie doświadczeń na modelach roślinnych.

Wyniki rozprawy przedstawiono na 46 stronach, a sposób ich prezentacji nie budzi moich zastrzeżeń. Zostały one odpowiednio zilustrowane przemyślanymi rycinami (26), które są pomocne w lekturze tej części pracy. W większości eksperymentów zastosowano wymagane kontrole, a gdy było to konieczne, uzyskane wyniki (a tym samym wnioski na ich podstawie) wsparto odpowiednio dobranymi analizami statystycznymi.

Dyskusja rozprawy jest dojrzała i wyczerpująca. Została ona przeprowadzona na tle bogatego zestawu literatury (zacytowano łącznie 264 prace), obejmującego również najnowsze pozycje z poruszanej dziedziny. Rozdział ten stanowi wartościowe dopełnienie rozprawy i przynosi odpowiedzi na kilka pytań, które nasuwają się podczas lektury Wyników.

Pod względem edycyjnym praca została bardzo dobrze przygotowana. Drobne niedociągnięcia, błędy literowe, określenia żargonowe czy interpunkcyjne są nieliczne i nie wpływają na wysoce pozytywny odbiór i ocenę całej rozprawy. Z obowiązku recenzenta

zwrócić jedynie uwagę, że powinniśmy mówić o zakresie gospodarzy plazmidu, a nie o zakresie gospodarza (str. 70), a także uwzględnić fakt, że Marion Bradtford to kobieta – powinniśmy więc mówić o metodzie Bradtford a nie Bradtforda (str. 79). Prace czyta się bardzo dobrze. Została napisana dobrym językiem, z dużą precyzją i klarownością w formułowaniu myśli i wniosków.

Ocena merytoryczna wyników rozprawy

Celem naukowym, skłaniającym do podjęcia badań opisanych w rozprawie, było poznanie mechanizmów wpływających na ekspresję genu *rosR* *R. leguminosarum* bv. trifolii, kodującego regulator transkrypcji z rodziny RosR/MucR, a także określenie roli białka RosR w regulacji ekspresji innych genów tej bakterii. Nie była to praca od podstaw, bowiem gen ten był obiektem wcześniejszych badań, prowadzonych z udziałem promotora niniejszej rozprawy, prof. Moniki Janczarek. W trakcie tych badań wykazano m.in., że ekspresja genu *rosR* jest negatywnie regulowana przez produkt tego genu. Stwierdzono także, że gen ten zawiera dwa promotory usytuowane w bliskim sąsiedztwie potencjalnych sekwencji regulatorowych, a także że mutacja w genie *rosR* ma plejotropowy charakter, co sugerowało zaangażowanie białka RosR w regulację ekspresji większej liczby genów analizowanego szczepu. Wyniki przedstawione w ocenianej rozprawie stanowią więc rozwinięcie i dopełnienie tych badań, co osiągnięto poprzez realizację trzech głównych zadań badawczych.

Pierwsze zadanie zakładało szczegółową analizę regionu regulatorowego, zawierającego promotory genu *rosR*. Badania rozpoczęto od mutagenazy ukierunkowanej wybranych motywów sekwencji o strukturze odwróconych powtórzeń (IR), a także motywów UP i TGn-extended -10. Zmutowane warianty regionu regulatorowego, sklonowane w formie fuzji transkrypcyjnych w wektorze testowym, posłużyły do zbadania wpływu mutacji na poziom transkrypcji tego genu (metodą Real-Time qPCR), a także translacji, poprzez zbadanie aktywności powstającego enzymu reporterowego – beta-galaktozydazy. W obu podejściach eksperymentalnych zaobserwowano analogiczne tendencje w represji bądź aktywacji genu *rosR*, wskazujące na istotną rolę czterech motywów IR oraz motywu UP w zapewnieniu właściwej ekspresji tego genu. Nie znalazłem w pracy informacji, czy mutacje wprowadzone w motywach IR1 i UP spowodowały również zmiany w sekwencjach nakładających się motywów cAMP-CRP i PHO-box – poprosiłbym o komentarz na ten temat.

Ważnym osiągnięciem tej części pracy było również zademonstrowanie wpływu innego białka regulatorowego – PraR na ekspresję *rosR*. Wytypowano prawdopodobne miejsce interakcji tego białka z DNA. Informacją istotną dla czytelnika jest również lokalizacja motywu PraR-box w sekwencji regionu regulatorowego genu *rosR* i jej

usytuowanie względem innych obecnych tam motywów, co, niestety, nie zostało w pracy przedstawione.

Drugie główne zadanie badawcze rozprawy zakładało zdefiniowanie regulonu RosR. W tym celu konieczne było odczytanie kompletnej sekwencji nukleotydowej genomu szczepu Rt24.2 oraz przeprowadzenie porównawczych analiz transkryptomicznych szczepu dzikiego i mutanta w genie *rosR*. Zaobserwowano rozległe zmiany w transkryptomie mutanta, obejmujące ponad 1000 genów, co jednoznacznie dowiodło roli białka RosR w globalnej regulacji ekspresji genów analizowanego szczepu. Geny o zmienionym profilu ekspresji pogrupowano, przypisując je do poszczególnych grup funkcyjnych (COG, ang. *clusters of orthologous genes*), co jednocześnie przyniosło sugestie na temat zaangażowania komponentów regulonu w różne procesy metaboliczne. Dopełnienie tych badań stanowiły analizy z zakresu proteomiki porównawczej, które uwidoczniły korelację zmian poziomu ekspresji genów ze zmianami na poziomie proteomu szczepu mutanta.

Wyniki ilustrujące tak szeroki zakres zmian w transkryptomie nie są łatwe do szczegółowej interpretacji ze względu na nakładanie się efektów regulacji pośredniej, wynikającej m.in. z represji bądź aktywacji innych regulatorów. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę dowiodły, że najliczniejszą grupę w regulonie *rosR* stanowią geny czynników transkrypcyjnych, co świadczy o złożonej strukturze tej sieci regulacyjnej.

Przeprowadzone w pracy analizy, mające na celu wytypowanie puli genów podlegających bezpośredniej regulacji przez RosR, doprowadziły do wyróżnienia 195 genów, zawierających w regionach regulatorowych potencjalne motywy RosR-box. Motywy te charakteryzuje duże zróżnicowanie sekwencji, co zostało szczegółowo omówione w Dyskusji rozprawy. Przewidywania *in silico* postanowiono zweryfikować eksperymentalnie, poprzez detekcję kompleksów nukleoproteinowych RosR z RosR-box techniką EMSA. Analizom poddano 10 wybranych genów, w każdym przypadku obserwując wiązanie oczyszczonego zrekombinowanego białka RosR z analizowanymi fragmentami DNA. W przeprowadzonych eksperymentach nie znajdują jednak układu kontrolnego. Brak kontroli negatywnej, wykorzystującej fragmenty DNA nie zawierające RosR-box, oraz niezastosowanie w mieszaninach reakcyjnych kompetytorowego DNA, nie pozwala, moim zdaniem, jednoznacznie wnioskować o specyficzności uwidoczniionych oddziaływań.

Trzecie główne zadanie badawcze rozprawy zakładało przeprowadzenie analizy porównawczej fenotypów analizowanych szczepów *R. leguminosarum*. Ich celem było sprawdzenie, na ile zaobserwowane wcześniej różnice w transkryptomie i proteomie mutanta *rosR*, przekładają się na zmiany w fenotypie tego szczepu. Analizy te dowiodły, że brak białka RosR wpływa na wydłużenie czasu generacji szczepu mutanta, wielkość i morfologię jego komórek, przepuszczalność błony zewnętrznej oraz ilość wytwarzanych polisacharydów. Kluczowe eksperymenty dotyczyły jednak analizy zdolności symbiotycznych. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka jednoznacznie

wykazała, że mutacja w genie *rosR* wpływa negatywnie na symbiotyczne interakcje bakterii z gospodarzem roślinnym poprzez zmniejszenie efektywności zakażenia roślin i zasiedlania zakażonych brodawek, a także indukowanie mniejszej liczby brodawek, nieefektywnych w wiązaniu azotu.

W trakcie przeprowadzonych badań Doktorantka zgromadziła dużą ilość wartościowych wyników oraz poczyniła wiele ciekawych obserwacji. Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy uważam:

- określenie roli motywów IR w regulacji ekspresji genu *rosR*,
- zbadanie funkcji motywów *UP* i *TGn extended-10* promotora *rosR* – były to pierwsze analizy tego typu przeprowadzone dla promotora ryzobiów,
- wykazanie roli motywów IR5 i IR6 w tworzeniu i stabilizacji drugorzędowych struktur transkryptu genu *rosR*,
- identyfikację nowego regulatora zaangażowanego w ekspresję *rosR* – białka PraR, będącego również regulatorem genów odpowiadających za *quorum sensing*,
- zdefiniowanie zakresu regulonu *rosR* oraz wytypowanie puli genów podlegających regulacji bezpośredniej,
- wyznaczenie konsensusu sekwencji nukleotydowej miejsc wiązania białka RosR,
- wykazanie udziału tego białka w regulacji syntezy różnych typów polisacharydów powierzchniowych,
- powiązanie ekspresji genu *rosR* z funkcjami symbiotycznymi *R. leguminosarum* bv. trifolii.

Podsumowując chciałbym pokreślić ogrom prac przeprowadzonych przez Doktorantkę. Analizowane zagadnienie badano kompleksowo, zarówno na poziomie genu, jak i regulonu, transkryptomu, proteomu, a także na poziomie fenotypu, angażując przy tym liczne techniki, metody i podejścia eksperymentalne. Zgromadzono dzięki temu dużą ilość danych na temat regulonu *rosR*, który jest istotnym elementem złożonej sieci globalnej regulacji ekspresji genów *R. leguminosarum*. Istotnym rozwinięciem tych badań było wykazanie udziału regulonu *rosR* w regulacji przebiegu wielu procesów metabolicznych, warunkujących adaptację bakterii do różnych środowisk bytowania, w tym do nawiązania relacji symbiotycznych z roślinami.

Złożoną sieć regulacji regulonu *rosR* Doktorantka przedstawiła schematycznie na rycinie 47. w rozdziale Dyskusja. Rycina ta podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat regulonu *rosR* *R. leguminosarum* bv. trifolii, a jednocześnie podkreśla wagę i wkład wyników ocenianej rozprawy w zrozumienie podstaw funkcjonowania tego regulonu. Należy podkreślić, że zdecydowana większość wyników przedstawionych w rozprawie została już opublikowana w uznanych czasopismach z listy JCR, a sądząc po wzrastającej liczbie cytowań, wyniki tych prac znajdują zainteresowanie i uznanie w środowisku naukowym.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi w pełni oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi ogólnej wiedzy mgr Kamili Rachwał oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych. W mojej ocenie, rozprawa ta całkowicie spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. Wnoszę więc do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Kamili Rachwał do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych badań, wartość naukową zgromadzonych wyników oraz ich opublikowanie w uznanych periodykach, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik