

Dr hab. Adam Waśko

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii

i Żywienia Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: „Białko RosR jako globalny regulator ekspresji genów *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii 24.2”

wykonanej przez mgr Kamilę Rachwał w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

pod kierunkiem: dr hab. Moniki Janczarek, prof. UMCS

Podstawa wykonania i przedmiot recenzji:

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w sprawie powołania recenzentów, w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania stopnia naukowego doktora p. mgr Kamili Rachwał – przekazaną pismem Dziekana Wydziału Biologii i Biotechnologii – prof. dr hab. Kazimierza Trębacza z dnia 30.11.2017 roku. Recenzja uwzględnia wymogi Ustawy o stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (opublikowanej w Dz. U. Nr. 65, poz. 595, z późn. zm.).

Przedmiotem recenzji jest 169 stronicowe opracowanie, wykonane w oparciu o wyniki kilkuletnich badań Autorki. Zgodnie z informacją podaną przez mgr Rachwał na stronie 3 rozprawy doktorskiej eksperymenty wykonane w ramach pracy częściowo sfinansowane zostały ze środków NCN (nr DEC-2012/07/B/NZ1/00099) a część wyników opublikowano

w dwóch artykułach naukowych z listy JCR. Precyzyjnie sformułowany tytuł dysertacji odpowiada zawartej w niej treści. Rozprawa, rozpoczynająca się streszczeniem w języku polskim i angielskim, ma strukturę typową dla tego rodzaju opracowań i składa się z 9 rozdziałów: „Wstęp” obejmujący przegląd piśmiennictwa, „Cel pracy” obejmujący cel główny i cele szczegółowe, „Materiał i metody badań”, „Omówienie wyników badań”, „Dyskusję wyników”, „Wnioski”, „Literaturę”, „Spis rysunków i tabel” – całość zawiera 47 rysunki i 12 tabel. Literatura to 13 stronicowy (264 pozycje) spis odnośników literaturowych, z których 98% to literatura anglojęzyczna a 47% to pozycje z ostatnich 10 lat. Wykorzystane jako źródła naukowe przez Autorkę dysertacji oryginalne prace eksperymentalne są merytorycznie właściwe i starannie dobrane z uwzględnieniem najważniejszych pozycji literatury światowej. Uzupełnia go wykaz danych statystycznych, baz sekwencji nukleotydowych i białkowych oraz wielu programów bioinformatycznych wykorzystanych w recenzowanej pracy doktorskiej. *W opinii Recenzenta uzupełnieniem do ww. rozdziałów pracy mógłby być Wykaz skrótów, który ułatwiłby poruszanie się po tekście.* Praca stanowi zwartą całość, została napisana starannie zarówno pod względem merytorycznym jak i językowym. Na uwagę zasługuje forma graficzna pracy, która w znaczący sposób ułatwia przekazywane przez Autorkę informacje a jednocześnie pomaga wyjaśnić i wyróżnić istotne fragmenty pracy.

Wprowadzenie do treści dysertacji : Mikroorganizmy, zasiedliły niezwykle szeroki wachlarz środowisk, poczynając od tych, w których istnieją optymalne warunki do ich rozwoju, do ekstremalnych gdzie żyją bakterie wyspecjalizowane pod względem fizjologicznym i genetycznym. Mikroorganizmy istniały od miliardów lat bez roślin i zwierząt natomiast życie roślin i zwierząt jest całkowicie uzależnione od świata mikroorganizmów. Jednym z wielu przykładów oddziaływań organizmów prokariotycznych z eukariotycznymi jest zjawisko symbiozy bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną. Wzajemna współzależność pomiędzy roślinami a bakteriami brodawkowymi to współżycie dwóch organizmów, z którego oba wynoszą korzyść. Mikrosymbiont przekształca azot atmosferyczny w amoniak, zaopatrując tkanki roślin w aminokwasy i białka. W zamian gospodarz roślinny dostarcza bakteriom powstające w fotosyntezie cukry i inne substancje. Symbioza jest zatem podstawowym i jednocześnie naturalnym systemem dzięki któremu w środowisku może zachodzić proces biologicznego wiązania azotu. Proces ten jest niezwykle istotny z punktu widzenia ochrony środowiska (ograniczenie stosowania nawozów sztucznych) jak również możliwości stosowania zrównoważonego czy też ekologicznego

rolnictwa. Jednocześnie nie należy zapominać o roli jaką odgrywa biologicznie wiązanie azotu (BNF, biological nitrogen fixation) w obiegu tego pierwiastka w przyrodzie. Dlatego też badania nad bakteriami symbiotycznymi mają wymiar nie tylko poznawczy ale również bardzo praktyczny poprzez dostarczanie informacji na temat możliwości zwiększenia efektywności wiązania azotu w różnych układach symbiotycznych. Gatunek *R. leguminosarum* biotyp *trifolii* tworzy wysoce specyficzny układ symbiotyczny z koniczyną, co jest charakterystyczne dla wszystkich gatunków rizobiów. Drobnoustroje te charakteryzują się plastycznym metabolizmem co pozwala im zasiedlać różne nisze ekologiczne (gleba, ryzosfera, brodawki) i przetrwać w bardzo zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Ma na to wpływ budowa genomu, który składa się z 4-9 replikonów: kolistego chromosomu i kilku dużych plazmidów w zależności od szczepu. Pomimo tego, że genomy różnych szczepów *R. leguminosarum* biotyp *trifolii* są sekwencjonowane od 2008 roku i deponowane w genomowych bazach danych to relatywnie niewiele danych dostępnych jest na temat ekspresji genów tego gatunku w zależności od zmieniających się warunków środowiskowych. W ten obszar badań, z zakresu szybko rozwijającej się genomiki, traskryptomiki i proteomiki, dającego możliwość badania znacznie szerszego zakresu symbiozy, a także wykorzystania ich praktycznego przez człowieka, wpisuje się oceniana dysertacja. Problem ten jest umiejscowiony w naukach biologicznych i może być podstawą opracowania dysertacji na stopień naukowy doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Merytoryczna i językowa ocena dysertacji:

Praca rozpoczyna się od „Streszczenia” w języku polskim, które obejmuje krótkie wprowadzenie, omówienie celu pracy, poszczególnych jej etapów oraz charakterystykę najważniejszych wyników. Kolejnym elementem pracy jest Abstract napisany w języku angielskim.

W części teoretycznej zawarto „Wstęp” i dokonano „Przeglądu literatury”. Doktorantka opisała biologiczne wiązanie azotu BNF w kontekście podziału na diazotrofy wolnożyjące i organizmy symbiotyczne, ze szczególnym uwzględnieniem rizobiów. Dalsze rozdziały tej części pracy poświęcono organizacji genomów różnych gatunków z rodzaju *Rhizobium*, powierzchniowym polisacharydom wytwarzanym przez te bakterie,

mechanizmom warunkującym przystosowanie do życia w środowisku glebowym przez rizobia, szeroko pojętemu procesowi symbiozy a także białkom regulatorowym z rodziny Ros/MucR. Czytając tę część dysertacji recenzent zapoznaje się nie tylko z informacjami naukowymi pochodzącymi z prac przeglądowych ale również z wynikami badań dotychczasowych eksperymentów. Wiedza na temat bakterii z rodzaju *Rizobium* ich genetyki i symbiozy z roślinami podawana jest w układzie ilościowym i jakościowym z jednoczesną analizą wyników otrzymanych przez innych autorów i jej umiejętnym wykorzystaniem w rozdziałach Materiały i metody badań oraz Wyniki i Dyskusja. Podsumowując można stwierdzić, że dokonany przegląd literatury świadczy o przemyślanym podejściu Autorki do podjętej tematyki i uzasadnia wybór tematu pracy.

W przedstawionej do oceny pracy sformułowano cel główny, który został dobrze określony i znajduje swoje uzasadnienie we wcześniej przedstawionym przeglądzie piśmiennictwa. Cel ten został uzupełniony w pięć celów szczegółowych (*w opinii recenzenta drugi cel szczegółowy „ustalenie wpływu wybranych nadrzędnych białek regulatorowych na ekspresję genu rosR” nie do końca znalazł odzwierciedlenie we wnioskach końcowych pomimo, że w pełni został zrealizowany i opisany w pozostałych rozdziałach pracy. Przypuszczam że był to niezamierzony efekt i traktuję go jako przeoczenie*). Postawione cele są poznawcze, z aspektami aplikacyjnymi i nowatorskie na świecie i w Polsce, co w pełni uzasadnia podjęcie badań.

Ocena wyników badań jest determinowana metodami zastosowanymi w pracy. Metodyka pracy jest obszerna i stanowi 34 strony. Jest dobrze przemyślana i właściwie merytorycznie dobrana. To pozwala Recenzentowi na precyzyjne ustalenie, które elementy eksperymentu zostały zaczerpnięte z literatury a które są wytworem myśli intelektualnej doktorantki i jaki mają udział w całości tych nowatorskich badań. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania zostały zaplanowane w sposób logiczny a ich realizacja i przebieg zostały opisane w sposób zrozumiały i bardzo skrupulatny, bez zbędnych treści. Na szczególną uwagę zasługuje odpowiednie połączenie narzędzi bioinformatycznych z zaawansowanymi technikami sekwencjonowania genomu, transkryptomu oraz proteomu. Tak kompleksowe podejście w sposób zdecydowany ułatwiło mgr Rachwał poprawną interpretację wyników i późniejszą dyskusję. Zamieszczenie w bazie GenBank BioProjektów o numerach akcesyjnych MAMO00000000 i PRJNA325742 pozwala Recenzentowi na docenienie ogromu pracy wykonanej przez Doktorantkę a jednocześnie umiejętne

selekcjonowanie informacji zawartej w dysertacji. Ważnym aspektem poznawczym proponowanych badań był bardzo żmudny i perfekcyjnie wykonany etap, zdecydowanie decydujący o dalszym postępowaniu badawczym, dotyczący wykorzystania ukierunkowanej mutagenезы motywów zlokalizowanych w regionie regulatorowym genu *rosR*. Autorka pracy do tego celu wykorzystwała niskokopijny plazmid pMP220 poddany trawieniu enzymami restrykcyjnymi późniejszej ligacji, transformacji *E. coli* i koniugacji rodzicielskiej z *R. leguminosorum* bv. *trifolii*. Podejście takie wymagało od Doktorantki zdecydowanie większego nakładu pracy i dało bardzo dobre rezultaty, pomimo coraz częściej stosowanych komercyjnych zestawów do ukierunkowanej mutagenезы, takich chociażby jak QuikChange™ firmy Stratagene. Zastosowana metodyka pozwoliła na uzyskanie odpowiednich konstruktów genetycznych w postaci szczepów niosących plazmidy z fuzjami transkrypcyjnymi różnych wariantów, które zostały wykorzystane w dalszej części badań. Dzięki temu możliwe było kompleksowe podejście do analizowanej problematyki badawczej, zaś precyzyjnie ustawiony warsztat badawczy umożliwił w logiczny i konsekwentny sposób osiągnięcie celów badawczych. Zakres wykonywanych badań oraz ich różnorodność, jest zdaniem Recenzenta imponujący a na podkreślenie zasługuje ich logiczne i konsekwentne powiązanie przez Doktorantkę w realizacji celów. Część metodyczna wyróżnia się dużą ilością, nowoczesnością i oryginalnością szeregu metod i technik badawczych. Prawidłowo wykonane opracowanie statystyczne wyników umożliwiło wiarygodne i poprawne ich uzasadnienie oraz dyskusję w następnym rozdziale pracy. Recenzent nie wnosi uwag do przedstawionej części pracy, aczkolwiek nasuwają się dwa pytania mające charakter uzupełniający przedstawioną metodykę: *jakie warunki zastosowano podczas procesu sonifikacji przy izolacji białek błonowych (moc, czas, cykle, temperatura), czy podczas izoelektroogniskowania wszystkie frakcje białek rozdzielono w takich samych warunkach procesu (czas, gradient napięcia)*. Na podstawie przedstawionego w tej części pracy zakresu badań można stwierdzić, że postawione tezy badawcze należą do oryginalnych w obszarze nauk biologicznych, a otrzymane wyniki powinny uzupełnić naszą wiedzę na temat mechanizmów regulacji transkrypcji w komórkach *R. leguminosorum* bv. *trifolii*, co ma swoje istotne znaczenie zarówno w naukach podstawowych jak i stosowanych.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka w przystępny i wyczerpujący sposób opisała rezultaty poszczególnych badań. Podział na 10 podrozdziałów nawiązujących do opisu etapów badań w rozdziale „Materiały i metody” ułatwiło analizę wyników poszczególnych grup eksperymentów i konfrontację z dyskusją z rozdziału „Dyskusja”.

Pierwszy etap przeprowadzonych badań pozwolił na określenie roli wybranych motywów w regionie promotorowym *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na aktywność transkrypcyjną tego genu. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdza, że element UP, motywy IR2, IR5 oraz region 3'IR6 odgrywają pozytywną rolę w regulacji transkrypcji *rosR*. Jednocześnie region 5' motywu IR1, region 3'IR3 oraz region 5' IR6 biorą udział w negatywnej regulacji transkrypcji *rosR*. Autorka pracy weryfikuje również informację na temat roli elementu „TGn-extended – 10” w transkrypcji badanego genu. Wyniki tego etapu badań mgr Rachwał potwierdziła stosując zarówno analizę ilości transkryptów *rosR* różnych wariantów plazmidowych z wykorzystaniem techniki RT-qPCR jak i wykorzystując pomiar aktywności β -galaktozydazy szczepów zawierających odpowiednie konstrukty genetyczne. Logicznym następstwem tego etapu badań było wykonanie przez Doktorantkę analizy *in silico* roli motywów IR5 i IR6 w tworzeniu struktur drugorzędowych mRNA oraz zbadanie ich stabilności. Recenzent pracy docenia takie podejście Autorki ponieważ nie ograniczyła się ona tylko do dobrze udokumentowanych wyników swoich eksperymentów, ale również podjęła próbę powiązania zmian w sekwencjach genów ze stabilnością struktury drugorzędowej mRNA w oparciu o ich termodynamiczną trwałość. Wyniki tej niezależnej analizy potwierdziły, że mutacje w regionach IR5 i IR6 obniżają wartość energii swobodnej mRNA, co ma wpływ na stabilizację struktur drugorzędowych mRNA *rosR*.

W kolejnym etapie badań mgr Rachwał zaprezentowała wyniki związane z analizą wpływu zidentyfikowanych motywów w regionie promotorowym *rosR* na ewentualne możliwości oddziaływania z białkami regulatorowymi typowymi dla rizobiów. Jako modele białek regulatorowych zostały wybrane: kinaza histydynowa (ChvG) oraz białka CinR i PraR typowe dla systemu quorum-sensing. Doktorantka stwierdziła, że białka ChvG i CinR nie biorą udziału w regulacji ekspresji genu *rosR*, natomiast białko PraR wiąże się z regionem promotorowym badanego genu i wpływa na jego ekspresję.

W dalszej części badań Doktorantka prezentuje wyniki badań transkryptomicznych opartych o analizę RNA-seq w powiązaniu z wcześniej przeprowadzonym sekwencjonowaniem genomów szczepu dzikiego i zawierającego mutację w genie *rosR*. Głównym celem tej części badań była identyfikacja wszystkich genów należących do regulonu *RosR*. Globalna analiza wyników tej części pracy pokazała, że ekspresja 1106 genów była na odmiennym poziomie w szczepie zawierającym mutację w *rosR* w porównaniu

do szczepu dzikiego. Z czego ponad 63% genów wykazywała wyższą ekspresję w mutancie *rosR* co ewidentnie pokazało, że RosR funkcjonuje głównie jako represor w komórkach *R. leguminosorum* bv. *trifolii*. Autorka pracy wszystkie geny regulonu RosR sklasyfikowała zgodnie z ich potencjalnymi funkcjami pełnionymi w komórce. Takie podejście pozwoliło na uzyskanie kategorii funkcjonalnych genów i ułatwiło Autorce dalszą analizę wyników, które zostały precyzyjnie opisane. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że w szczepie z mutacją w genie *RosR* znalazły się 4 grupy genów, których ekspresja była niższa niż w szczepie dzikim. Powiązane były one z transportem i metabolizmem aminokwasów, ruchliwością, syntezą struktur powierzchniowych oraz podziałem komórkowym. Zdolność do właściwej interpretacji tak dużej ilości wyników uzyskanej w tej części pracy świadczy, że Doktorantka posiada doświadczenie przydatne do planowania i realizacji badań naukowych, a także interpretacji otrzymanych wyników, co jest oczekiwane od osób ze stopniem naukowym doktora.

Ciekawy wątek badań przedstawiony w pracy dotyczył analizy profili białkowych różnych frakcji białek komórkowych w celu określenia wpływu mutacji w genie *rosR* na proteom *R. leguminosorum* bv. *trifolii*. Doktorantka porównała białka zewnątrzkomórkowe, błonowe oraz peryplazmatyczne szczepów zawierających mutację w genie *rosR* z profilem tych samych białek szczepu dzikiego. W tym celu mgr Rachwał zastosowała szereg standardowych technik z zakresu proteomiki funkcjonalnej tj. elektroforezę jedno i dwuwymiarową (1D i 2D-PAGE), Western blotting, spektrometrię mas połączoną ze źródłem jonów typu electrosprey (ESI) oraz EMSA jako narzędzie do zbadania interakcji białka RosR z genami należącymi do regulonu RosR. Ta część pracy dodatkowo została bardzo precyzyjnie uzupełniona o narzędzia bioinformatyczne pozwalające na wykazanie motywów znajdujących się w sekwencji nukleotydowej regionu regulatorowego *rosR*. Recenzent docenia również bardzo umiejętne przedstawienie wyników uzyskanych w tej części badań, które wzajemnie się uzupełniają i dowodzą że zastosowane metody zostały dobrze dobrane w celu wykazania miejsc wiązania białka RosR z motywami RosR-box.

W ostatnim rozdziale Doktorantka skupiła się na określeniu wpływu mutacji w badanym genie na właściwości fenotypowe komórek *R. leguminosorum* bv. *trifolii*. Stosując szereg metod badawczych (TEM, AFM, mikroskopia fluorescencyjna) Autorka pracy w sposób niebudzący wątpliwości wykazała, że mutacja w genie *RosR* ma wpływ na adhezję, ruchliwość oraz tworzenie rzęsek w komórkach bakterii. Analogicznie mutacja

w badanym genie była przyczyną zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej bakterii, zmniejszonej syntezy EPS-ów, a także wpływała negatywnie na właściwości symbiotyczne bakterii. Doktorantka wykazała, że szczep z mutacją zakazał znacznie wolniej korzenie koniczyny wytwarzając нефunkcjonalne brodawki, w których obecność komórek bakterii była nieregularna i znacznie mniej aktywna metabolicznie. Podsumowując należy stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały dobrze i ostrożnie zinterpretowane z uwzględnieniem stanowiska krytycznego.

Dyskusja przedstawiona w recenzowanej pracy ma charakter przyczynowo-skutkowy w odniesieniu do uzyskanych wyników. Doktorantka w sposób wyczerpujący i z dużym znawstwem problemu, swobodnie konfrontuje wyniki własnych badań z doniesieniami innych autorów. Należy podkreślić duży obiektywizm w przytaczaniu argumentów za i przeciw własnym ustaleniom oraz konsekwencję w dociekaniu przyczyn obserwowanych zmian. Pozwoliło to na uwypuklenie wielu spójności z badaniami innych autorów a także niekwestionowanych elementów nowości.

W zamykających rozprawę 7 punktowych „Wnioskach” Doktorantka zawarła główne rezultaty swojej pracy. Podzielałam opinię Autorki pracy, którą przedstawiła w jednoznacznie sformułowanych oraz skorelowanych z celem i zakresem pracy wnioskach. Jednocześnie warto podkreślić, że przedstawione wnioski potwierdzają zarówno poznawczy charakter jak i rozwojowy potencjał przedstawionej do oceny dysertacji. To stwierdzenie pozwala Recenzentowi poprosić Doktorantkę o rozważenie następujących zagadnień podczas dyskusji:

Jakie są możliwości wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 w badaniach obejmujących tematykę zaprezentowaną w ocenianej dysertacji?

*Jaką rolę ogrywa białko RosR jako globalny regulator ekspresji genów u *R. leguminosorum* bv. *trifolii* w inicjacji symbiozy bakterii z koniczyną?*

Wniosek końcowy

Moje uwagi zawarte w recenzji mają głównie charakter komentarzy i sugestii odnośnie ewentualnych dalszych analiz bogatego materiału zgromadzonego w ramach pracy. Podsumowując dysertację oceniam bardzo wysoko, doceniam jej oryginalność, trud wniesionej pracy, dociekliwość, konsekwencję, wyróżniającą zaplanowaną część metodologiczną, merytoryczną dyskusję w odniesieniu do wyników innych autorów oraz

prawidłowe wnioskowanie. Praca wnosi duży ładunek nowości w naukach biologicznych w dyscyplinie biologia. Wyniki przedstawione w dysertacji pogłębiają wiedzę na temat molekularnego podłoża ekspresji genów w komórkach bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz ich wpływu na fenotyp tych bakterii. Z powyższych powodów stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.

W tej sytuacji jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa mgr Kamili Rachwał pt.: „Białko RosR jako globalny regulator ekspresji genów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24.2” stanowiąc oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe odpowiada wymaganiom stawianym pracom na stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, a także spełnia merytoryczne i formalne kryteria stawiane w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr. 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Kamili Rachwał do kolejnych etapów przewodu doktorskiego – celem nadania jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

