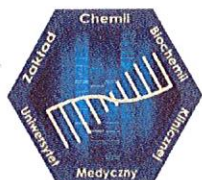




UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Łódź, 22.12.2017

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
Kierownik Zakładu i Katedry  
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Ewelina Błaszczuk

**„Poli(A) polimeraza PAPI jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych  
leków przeciwgruźliczych”**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Jarosława Dziadka

w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*

Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Eksperti Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oceniają, że *Mycobacterium tuberculosis* zabija rocznie ponad milion osób. Gruźlica wywołana przez prątki wrażliwe na leki jest chorobą w pełni uleczalną, jednak narastającym problemem są prątki gruźlicy odporne na leki, wielolekooporne, bądź o rozszerzonej oporności, których eradykacja jest niezwykle długim, kosztownym a często nieskutecznym procesem. Długi okres terapii, konieczność codziennego przyjmowania oraz brak skutecznych leków do zwalczania gruźlicy wskazuje na potrzebę poszukiwania nowych, skutecznych tuberkulostatyków, które pozwoliłyby na skrócenie terapii gruźlicy lekowrażliwej oraz umożliwiły eradykację szczepów wielolekoopornych. Ograniczona liczba miejsc docelowych w komórkach

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



prątków gruźlicy rozpoznawanych przez stosowane obecnie leki przeciwprątkowe wskazuje na konieczność poszukiwania alternatywnych tarcz molekularnych dla leków przeciwprątkowych nowej generacji. Nowych miejsc docelowych dla potencjalnych leków przeciwprątkowych należy poszukiwać wśród białek niezbędnych dla przeżycia *M. tuberculosis* w warunkach *in vitro* i/lub w zakażonym organizmie.

*Mycobacterium tuberculosis* to najgroźniejszy bakteryjny patogen człowieka odpowiedzialny w skali globalnej za 1,5 mln przypadków śmiertelnych każdego roku. Z drugiej strony gruźlica wywołana przez lekowrażliwe szczepy *M. tuberculosis* jest chorobą w pełni uleczalną choć wymagającą przeprowadzenia aż sześciomiesięcznej terapii z równoczesnym stosowaniem 2-4 leków przeciwprątkowych. Leki przeciwgruźlicze nowej generacji powinny działać na unikalne miejsca docelowe w komórce bakterii aby móc skutecznie eliminować szczepy odporne na obecnie stosowane tuberkulostatyki. Optymalne miejsca docelowe dla leków powinny być niezbędne do wzrostu bakterii w warunkach *in vitro* lub przynajmniej do ich przeżycia podczas zakażenia. Optymalna tarcza docelowa dla leków nie może mieć swoich strukturalnych homologów w komórkach gospodarza, powinna posiadać potencjalne miejsca wiązania bądź oddziaływania z małymi cząsteczkami, innymi białkami czy też przeciwciałami wykorzystywanymi w terapii. Efekt bakteriobójczy lub bakteriostatyczny powinien być widoczny już przy częściowym obniżeniu stężenia docelowej molekuly w komórce bakterii. Dobrym celem dla nowych leków przeciwbakteryjnych mogą być białka o charakterze mutatorowym, których inaktywacja prowadzi do obniżenia częstości występowania mutacji spontanicznych w genomie prątków, co może prowadzić do obniżenia ich zdolności do nabywania lekooporności. Leki skutecznie inaktywujące białka mutatorowe mogłyby być podawane wraz z podstawowymi chemioterapeutykami.

Wśród genów wskazywanych jako niezbędne do wzrostu prątków gruźlicy, zidentyfikowanych w badaniach przesiewowych z wykorzystaniem mutagenyzy transpozonowej, znalazł się gen *pcnA* kodujący homolog białka poli(A) polimerazy (PAPI) z *E. coli*. Poliadenylaza PAPI odpowiedzialna jest za syntezę sekwencji poli(A) na 3' końcu transkryptów zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Wskazuje się, że Poli(A) polimeraza uczestniczy w globalnej regulacji poziomu transkryptów

w komórce. PAPI prątków gruźlicy wykazuje 33% identyczności ze swoim odpowiednikiem w *E. coli*. Mykobakteryjne białko PAPI nie zostało dotychczas scharakteryzowane pod względem funkcjonalnym. Wykazano natomiast obecność poliadenylowanych cząsteczek mRNA u mykobakterii świadcząca o obecności białka, o aktywności poli(A) adenylazy.

Narastający problem lekooporności gruźlicy, identyfikacja prątków wielolekoopornych o rozszerzonej oporności, a także całkowicie opornych na dostępne obecnie tuberkulostatyki, stanowi o konieczności poszukiwania nowych skutecznych leków, a także molekularnych miejsc docelowych w komórce prątków, które mogłyby stanowić „tarcze” dla antybiotyków nowej generacji. W odniesieniu do dostępnych danych eksperymentalnych głównym celem niniejszej pracy stała się molekularna ocena możliwości wykorzystania produktu genu *pcnA* jako potencjalnego miejsca docelowego dla nowych leków przeciwgruźliczych oraz jego charakterystyka funkcjonalna u mykobakterii. Gen ten, a także kodowany przez niego enzym, nie zostały jak do tej pory scharakteryzowane, ani jako potencjalne miejsca docelowe dla nowych leków, ani pod kątem funkcjonalnym. Należy podkreślić, że tematyka badań jest unikalna w skali światowej, a zrozumienie mechanizmu działania poli(A) polimerazy ma zasadnicze znaczenie dla dalszego rozwoju tego kierunku badań. Jest wysoce prawdopodobne, że zapoczątkowane w pracy nowatorskie badania mogą stanowić punkt wyjścia do badań *in vivo* oraz badań klinicznych.

Realizacja celu pracy nastąpiła poprzez ocenę niezbędności PAPI w komórkach prątków oraz uzyskanie warunkowego mutantu *M. smegmatis* charakteryzującego się obniżoną ekspresją białka PAPI. Ponadto, uzyskano rekombinowane białko PAPI i opracowano test enzymatyczny pozwalający na ocenę jego aktywności, również w obecności potencjalnych inhibitorów. Zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i w warunkach *in vitro*, wykazano bezpośrednie interakcje białka PAPI z białkami systemu naprawy DNA poprzez łączenie niehomologicznych końców (NHEJ) oraz zmapowano miejsca wiązania pomiędzy badanymi białkami. Ponadto wykazano zdolność wiązania mykobakteryjnego białka PAPI do jedno- i dwuniciowego DNA oraz do tworzenia kompleksów PAPI z białkiem Ku na podwójnej nici DNA. Analizy mutantu *M. smegmatis* charakteryzującego się obniżonym poziomem ekspresji białka PAPI wykazały jego

zwiększoną wrażliwość na wybrane czynniki mutagenne, takie jak: promieniowanie UV, chlorowodorek hydroksyloaminy oraz mitomycyna C. Proszę Doktorantkę o charakterystykę mechanizmu naprawy pęknięć dwuniciowych DNA z uwzględnieniem naprawy NHEJ oraz HRR. Jakiego znaczenia dla procesu regulacji cyklu komórkowego ma naprawa pęknięć dwuniciowych, w odniesieniu do efektywności terapii z zastosowaniem leków genotoksycznych.

Uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wyniki wskazują, iż mykobakteryjne białko PAPI posiada aktywność poli(A) polimerazy, jest niezbędne do wzrostu mykobakterii w warunkach *in vitro* i może być rozważane jako miejsce docelowe dla nowych leków przeciwpłatkowych. Opracowany test aktywności poliadenylazy *in vitro*, oraz uzyskany rekombinowany szczep *M. smegmatis* o obniżonym poziomie ekspresji białka PAPI, stanowią model genetyczny do weryfikacji potencjalnych inhibitorów mykobakteryjnej poli(A) polimerazy. Uzyskane wyniki wskazują również na zaangażowanie białka PAPI w procesach naprawy DNA u prątków. Zbadanie wrażliwości prątków na obniżenie poziomu białka PAPI w komórce wymagało konstrukcji mutantu posiadającego obniżony poziom białka PAPI. Proszę o odpowiedź na pytanie, jak w warunkach naturalnych *in vivo* regulowana jest aktywność poli(ADP) polimerazy.

U *Mycobacterium* system naprawy NER, zaangażowany jest w usuwanie uszkodzeń, z odkształconej struktury podwójnej helisy DNA, powstałych na skutek promieniowania UV lub przez działanie takich mutagenów jak MMC. Wykazano, że mutanty *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych genów *uvrB* i *uvrD* są nadwrażliwe na ekspozycję na światło UV oraz na MMC. Mutanty mykobakterii pozbawione funkcjonalnych genów *polA* (*M. smegmatis*), *uvrB* (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*) oraz *uvrD* (*M. smegmatis*) charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na promieniowanie UV. Ponadto, mutanty  $\Delta$ *uvrB* *M. smegmatis* i/lub *M. tuberculosis* wykazywały wrażliwość na reaktywne formy tlenu lub azotu. Naprawa DNA poprzez wycinanie zasad (BER) u mykobakterii indukowana jest w wyniku uszkodzeń oksydacyjnych, alkilacji czy metylacji zasad. Mutanty *M. smegmatis* pozbawione endonukleaz systemu BER wykazują wrażliwość na  $H_2O_2$ . Należy również pamiętać, że niektóre z zastosowanych mutagenów mają działanie plejotropowe prowadzące do powstania różnych typów uszkodzeń.

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Mitomycyna C, oprócz właściwości alkilujących, jest związkiem generującym wewnątrzniowe i międzyniowe połączenia (DNA *cross-links*), a także pojedyncze i podwójne pęknięcia DNA. Z zastosowaniem odpowiednich mutantów *M. smegmatis* wykazano, że w naprawie uszkodzeń wywołanych MMC uczestniczą procesy zależne od obecności białka RecA. Szczep *M. tuberculosis* pozbawiony zdolności do syntezy białka RecA, niezbędnego w naprawie podwójnych pęknięć DNA poprzez HRR oraz w globalnej odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA typu SOS, był 50-krotnie wrażliwszy na promieniowanie UV w porównaniu do szczepu kontrolnego.

W zrozumieniu roli PAPI w procesach naprawy DNA może być pomocne zbadanie aktywności tego enzymu w warunkach *in vitro* na matrycy DNA, której wiązanie obserwowano w niniejszej pracy doktorskiej. W najbliższym czasie planowane jest wykonanie takiego doświadczenia z wykorzystaniem testu opracowanego dla badania aktywności poli(A) polimerazy oraz różnorodnych cząsteczek DNA jako matrycy. Uzyskane w pracy wyniki są bardzo istotne ze względu na możliwości ich bezpośredniego zastosowania w wypracowanym modelu do analizy aktywności poli(A) polimerazy, nie tylko w komórkach prokariotycznych, ale również w komórkach eukariotycznych z uwzględnieniem komórek ludzkich. W tym aspekcie pracy, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie mechanizmu tzw. sprzężonej letalności w komórkach z defektem systemu HRR wykorzystywanego przy zastosowaniu inhibitorów naprawy DNA w terapii przeciwnowotworowej u ludzi, który w oparciu o autorski model może posiadać istotne zastosowanie jako nowatorska metoda badawcza o wysokiej użyteczności w praktyce klinicznej.

Poddając ocenie rozprawę doktorską mgr Eweliny Błaszczyk należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić wartościowy tematycznie dorobek publikacyjny, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Potwierdzeniem tego sukcesu są wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które opublikowane zostały w renomowanych czasopismach naukowym z listy JCR, w szczególności: *Tuberculosis* 2011 (IF 2,933); *Journal of Bacteriology* 2012, 2014 (IF 3,586) oraz *Molecular Microbiology* 2015 (IF 3,898). Potwierdza to również prezentacja wyników pracy na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Dlatego,

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



chciałbym podkreślić, że dysertacja Pani mgr Eweliny Błaszczyk stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pana Prof. Jarosława Dziadka oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu. Dodatkowym, bardzo ważnym wyznacznikiem wartości uzyskanych wyników i podjętej tematyki pracy doktorskiej jest ich finansowanie w ramach konkursów ze źródeł zewnętrznych, projekt realizowany był w ramach międzynarodowego grantu: „Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiska” (InterMolMed), finansowanego z programu POIG.01.01.02-10-107/09. Ponadto, wyniki uzyskane w doktoracie stały się podstawą przyznania w roku 2018 grantu NCN w programie Opus: "Enzymy metabolizmu RNA, PAP I i PNPaza, jako miejsca docelowe dla nowych leków przeciwprątkowych i ich funkcjonalna charakterystyka:", realizowanego przez Doktorantkę pod opieką kierownika tego autorskiego projektu Profesora Jarosława Dziadka. W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK  
Międzywydziałowej Katedry  
Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
*Ireneusz Majsterek*  
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl