

Wrocław 13.11.2018

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz
Z-d Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Antczak pod tytułem
„Analiza funkcjonalna wybranych „sierocych” białek regulatorowych
dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału u mykobakterii”**

Recenzowana praca została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii Mykobakterium, Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, pod opieką prof. dr hab. Jarosława Dziadka, w zespole od wielu lat zajmującym się biologią prątków. Temat pracy dotyczy jednego z mechanizmów odpowiedzi komórek *Mycobacterium* na stres środowiskowy. Prowadzone w ramach pracy badania mają znaczenie nie tylko poznawcze, pozwalające na zrozumienie fizjologii komórki bakteryjnej, ale także poszerzają wiedzę na temat możliwości zwalczania prątków. W kontekście wciąż niewyeliminowanych zakażeń, *M. tuberculosis* oraz rosnącego zagrożenia infekcjami powodowanymi przez prątki wielolekooporne wiedza ta może mieć ogromne znaczenie.

Doktorantka skupiła się na regulatorach transkrypcyjnych związanych z metabolizmem azotu. Celem pracy była odpowiedź na pytanie, jaka jest rola wybranych regulatorów transkrypcyjnych: białka kodowanego przez gen *msmeg_0432* (homolog *rv0260c*) indukowany podczas głodu azotowego oraz produktu genu *msmeg_5794*, globalnego czynnika transkrypcyjnego regulującego między innymi metabolizm azotu. Doktorantka wykonała szereg starannie zaplanowanych eksperymentów, w których wykorzystywała wyjątkowo bogaty warsztat badawczy. Przeprowadzone doświadczenia obejmowały zarówno konstrukcję zmodyfikowanych szczepów *M. smegmatis* jak i *M. tuberculosis*, analizy ich wzrostu oraz analizy fenotypowe przy użyciu systemu BIOLOG,

badania wrażliwości na czynniki stresowe, analizy transkryptomiczne, nadprodukcję i oczyszczanie białek, oraz analizy oddziaływania białek z DNA (technika EMSA). Analizy transkryptomiczne w warunkach głodu azotowego i warunkach optymalnych pozwoliły na identyfikację regulonów badanych czynników transkrypcyjnych, a to z kolei umożliwiło określenie potencjalnych miejsc wiązania badanych białek do DNA. Ich wiązanie do zidentyfikowanych regionów promotorowych zostało potwierdzone *in vitro*, co stanowi rzetelną weryfikację uzyskanych wyników. Co więcej, Doktorantka określiła wpływ delekcji genów kodujących badane regulatory na zdolność prątków wykorzystania różnych źródeł azotu oraz ich wrażliwość na obecność różnych czynników chemicznych oraz antybiotyków. Dodatkowo przeprowadzono analogiczne analizy szczepu *M. tuberculosis* pozbawionego genu kodującego kolejny regulator produkt genu *rv195*, ta część pracy stanowi ciekawe uzupełnienie wcześniej przedstawionych wyników. Za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki można uznać zidentyfikowanie istotnych czynników transkrypcyjnych regulujących metabolizm związków azotowych w komórkach prątków i potwierdzenie ich funkcji biologicznej zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, co oznacza że Doktorantka w pełni osiągnęła zamierzony cel badawczy.

W dalszej części mojej recenzji skupię się na omówieniu samej rozprawy doktorskiej. Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Wstęp pracy stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badań. Przedstawiono w nim, oprócz krótkiej charakterystyki bakterii należących do rodzaju *Mycobacterium*, ogólne informacje dotyczące regulacji ekspresji genów u bakterii, a następnie omówiono szczegółowo mechanizm działania systemów dwuskładnikowych, rolę kinaz i białek regulatorowych. Znaczną część wstępu stanowi zestawienie dostępnych informacji na temat kolejno wszystkich systemów dwuskładnikowych zidentyfikowanych u *M. tuberculosis*, a także sierocych białek regulatorowych. W dalszych podrozdziałach Wstępu Doktorantka omówiła metabolizm azotu u bakterii, skupiając się na szlakach metabolicznych niezbędnych do asymilacji azotu i ich regulatorach. Wstęp jest ilustrowany kilkoma rysunkami, niektóre z nich – np. rys 2 i 3 przedstawiające schematy systemów dwuskładnikowych oraz zestawienie takich systemów u *M. tuberculosis* stanowią przydatny dodatek ułatwiający czytanie tekstu. Jednak rysunki 4 i 5 przedstawiające geny zaangażowane w metabolizm są raczej trudne w odbiorze i, przez to, nieszczególnie pomocne. Można by zasugerować, że ułatwieniem byłoby podanie potencjalnej roli białek kodowanych przez wymienione na rysunkach geny, tam gdzie jest ona znana, i zaznaczenie białek o funkcji potencjalnych regulatorów. Formalne niedociągnięcie tej części pracy stanowi brak odnośników do rysunków w tekście.

Rozdział Materiały zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami zawiera tabele przedstawiające używane szczepy bakteryjne (Tabela 3.1) oraz wykaz oligonukleotydów używanych w pracy (Tabela 3.2), jednak zdaniem recenzenta, tabela 3.1 byłaby bardziej informatywna, gdyby zawierała również zmodyfikowane szczepy *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* używane w pracy, a nie tylko szczepy wyjściowe. Poza tym w rozdziale Materiały Doktorantka wymieniła drobiazgowo wszystkie stosowane podłoża, bufory, enzymy itp, co z jednej strony może stanowić przydatny materiał referencyjny, ale z drugiej strony, w niektórych przypadkach może być uznane za zbędne (na przykład Tabela 3.5 zawierająca dokładne informacje o używanych enzymach restrykcyjnych, z podaniem rozpoznawanej sekwencji). Warto zwrócić uwagę, że lepiej byłoby w rozdziale Materiały utrzymać konwencję tytułowania rysunków - we Wstępie rysunki były nazywane „figura” 1-7 a w Materiałach „rycina”, dodatkowo należałoby uzupełnić tekst o odnośniki do niektórych tabel np. 3.4. i 3.5.

Rozdział Metody stanowi dokładne i staranne zestawienie stosowanych procedur. Jediną moją wątpliwość wzbudziło umieszczenie w tym rozdziale schematu konstrukcji wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów typu DCO (rozdział 4.20 i rycina 4.4), podczas gdy konstrukcja mutantów chromosomalnych, czy schemat konstrukcji wektorów do nadprodukcji białek znalazły się już w rozdziale Wyniki (rozdział 5.2, rycina 5.5).

W rozdziale Wyniki Doktorantka opisała w poprawny, rzetelny i przejrzysty sposób kolejno wykonane eksperymenty. Wyniki są należycie ilustrowane, opisy rysunków są klarowne. Zabrakło mi jedynie trochę bardziej szczegółowego opisu wyników uzyskanych w eksperymencie z zastosowaniem macierzy fenotypowych. Drobna uwaga, o której warto wspomnieć celem udoskonalenia prezentacji wyników to zastrzeżenie, co do wykonania analizy uzyskanych przeciwciał anti-SUMO-Rv0260c, dla której nie pokazano kontroli z nieswoistym białkiem, co nie pozwala określić specyficzności przeciwciał.

Rozdział Dyskusja zawiera przemyślane interpretacje uzyskanych wyników i próby wytłumaczenia obserwowanych zjawisk. Dojrzały tok prowadzenia Dyskusji, umiejętność wyciągania logicznych wniosków w oparciu o poczynione obserwacje jak i dane literaturowe, oraz fakt, że rozprawa została przygotowana została w oparciu o ponad 130 pozycji literaturowych, niewątpliwie świadczą o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w tematyce badań.

Podsumowując formalną stronę przygotowania rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że nie zawiera ona znaczących uchybień. W tekście pracy zauważono tylko

pojedyncze zwroty żargonowe, czy inne niepoprawne sformułowania, takie jak „nadekspresja białka” – zamiast „nadekspresja genu”, czy „sztok laboratoryny” oraz sporadyczne błędy interpunkcyjne. Praca napisana jest poprawnym naukowym językiem,

Lektura Wyników i ich Dyskusji nasunęła mi jednak kilka pytań, które mogą stanowić podstawę do dalszej dyskusji w trakcie publicznej obrony:

1. Dlaczego przypuszczano, że białka Msmeg0432 i Msmeg5784 mogą wiązać się kooperatywnie i wspólnie regulować ekspresję genów? Jest to bardzo ciekawa hipoteza i wyniki eksperymentu EMSA ją potwierdzają, rzeczywiście w przypadku niektórych regionów promotorowych obserwowano kooperatywne wiązanie obu badanych regulatorów sugerujące ich współpracę. Analiza „Pull-down”, która miała na celu potwierdzenie bezpośredniego oddziaływania badanych białek, dała bardzo słaby pozytywny wynik (Rycina 5.16). Czy rozważano, że obecność DNA może wpłynąć na badane oddziaływanie? Czy Doktorantka mogłaby zaproponować kolejny eksperyment potwierdzający współdziałanie badanych białek?
2. Wykazano brak wzrostu szczepów z delecjami genów kodujących badane regulatory na podłożach z azotanami, jako jedynym źródłem azotu, co potwierdza brak zdolności asymilacji azotu. W rozdziale Dyskusja Doktorantka zaproponowała, że wyjaśnieniem obserwowanego fenotypu może być na przykład zaburzona ekspresja genów *nirB* i *nirD* kodujących kompleks reduktazy azotynów. Czy Doktorantka rozważyłaby eksperyment potwierdzający, że to obniżenie poziomu tych genów odpowiada za brak wzrostu szczepu z delecją *msmeg_0432* na podłożach z azotanami. Jak mógłby wyglądać taki eksperyment i jakiego wyniku można by oczekiwać?
3. W ostatnim etapie pracy sprawdzano wpływ eliminacji regulatora Rv195 (brak homologu i *M. smegmatis*) oraz Rv260 na wrażliwość *M. tuberculosis* na wybrane tuberkulostatyki. Rzeczywiście mutant pozbawiony genu *rv0260c* charakteryzował się wrażliwością na niektóre antybiotyki, jednak nie jest dla mnie całkiem jasne, co skłoniło Doktorantkę do sprawdzenia wzrostu badanego szczepu w tych warunkach i jak można powiązać wrażliwość na badane związki z metabolizmem azotu? Ciekawe wyniki uzyskano także w eksperymentach badających wrażliwość szczepów delecyjnych na reaktywne formy tlenu i azotu. Pomimo, że w Dyskusji, krótko omówiono potencjalne geny odpowiedzialne za taki fenotyp (strona 135), chciałabym prosić Doktorantkę o szersze wyjaśnienie tych zależności.

Na zakończenie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Magdaleny Antczak opisuje istotne osiągnięcie naukowe. Wysoko oceniam kompleksowy charakter badań oraz szeroki zakres technik stosowanych Doktorantkę, świadczący o jej doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego. Wspomniane pytania i wątpliwości nie wpływają w najmniejszym stopniu na bardzo pozytywną ocenę pracy, natomiast uwagi dotyczące samego przygotowania pracy mają jedynie charakter wskazówek na przyszłość.

Uważam, że pracy mgr Magdaleny Antczak w pełni odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora nauk biologicznych i w związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Antczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. J. J. J.', is located below the main text.