



UNIwersytet Gdański

IN OMNIBUS VIA TUA



WYDZIAŁ
BIOLOGII

UNIwersytet Gdański

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska@biol.ug.edu.pl
phone: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 19.11.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Magdaleny Antczak

**„Analiza funkcjonalna wybranych "sierocych" białek regulatorowych
dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału u mykobakterii”**

Systemy przekazujące sygnał są jedną z ważniejszych dróg komunikowania się komórek z otoczeniem, co szczególnie jest istotne dla jednokomórkowych organizmów, jakimi są bakterie. Liczne przykłady jak i rola systemów dwuskładnikowych zostały opisane na przykładzie organizmów modelowych jak i reprezentantów bakterii patogennych i wolnożyjących. U bakterii chorobotwórczych szybkie i skuteczne przekazywanie sygnału jest ważnym elementem przystosowania do efektywnego zasiedlania organizmów gospodarza. Dlatego poznanie mechanizmów funkcjonowania tych układów jak i ich podstaw genetycznych jest ważne dla wiedzy o ważnych procesach życiowych bakterii patogennych. Do takich należą prątki gruźlicy, *Mycobacterium tuberculosis*, będące czynnikiem etiologicznym choroby stanowiącej cały czas poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego oraz modelowy ich odpowiednik, szybko rosnące prątki *Mycobacterium smegmatis*. Pani mgr Magdalena Antczak w

swojej pracy podjęła się tematu badania czynników regulatorowych o niesprecyzowanej do tej pory funkcji u prątków na modelu patogennych i niepatogennych gatunków. Swoją pracę wykonywała w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, pod opieką Pana prof. dr hab. Jarosława Dziadka i Pani dr Renaty Płocińskiej, dzięki czemu mogła skorzystać z ogromnej wiedzy i doświadczenia w pracy nad prątkami, z której słynie zespół Pana Profesora.

Przedmiotem badań Pani Antczak były wybrane geny oraz kodowane przez nie białka o potencjalnej funkcji regulatorowej, dla których nieznane są kinazy spełniające rolę przekazywania sygnału z zewnątrz komórek, zwane białkami "sierocymi" (orphan). Doktorantka podjęła się szeroko zakrojonej i konsekwentnie przeprowadzonej charakterystyki dwóch białek *M. tuberculosis*, Rv0195 i Rv0260 oraz odpowiednika tego ostatniego białka u *M. smegmatis*, Msmeg_0432. W zakres pracy wchodziło zbadanie fenotypu bakterii pozbawionych odpowiednich genów, określenie globalnej roli tych regulatorów w komórce metodą analizy transkryptomu, skonstruowanie układów do nadprodukcji białek ze znacznikami, scharakteryzowanie oddziaływań pomiędzy białkami jak i białek z DNA. Wszystkie te badania wymagały zastosowania bogatego zestawu nowoczesnych i dobrze dobranych metod mikrobiologicznych, inżynierii genetycznej, biochemicznych jak i najnowszych metodologii "omicznych", co bardzo pozytywnie wpłynęło na poziom prezentowanej rozprawy.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej Pani Magdaleny Antczak zaliczyłabym:

- wykazanie, dzięki wieloetapowej i skomplikowanej konstrukcji odpowiednich szczepów niosących mutacje, iż badane regulatorowe białka nie są niezbędne dla przeżycia komórki,
- zidentyfikowanie miejsc wiązania czynników regulatorowych *M. smegmatis* (0423 i 5784) do DNA,
- scharakteryzowanie roli powyższych regulatorów *M. smegmatis* w szlakach metabolizmu azotu
- wykazanie funkcji białka Msmeg_0432 i jego odpowiednika u *M. tuberculosis*, Rv0260c w przeciwdziałaniu efektom stresu oksydacyjnego

Oceniana rozprawa ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Obszerny i jasno napisany Wstęp dobrze wprowadza w temat układów regulatorowych prątków oraz zagadnień

metabolizmu azotu, ułatwiając zrozumienie i docenienie części eksperymentalnej. Cele zostały określone łącznie ze szczegółowym opisem etapów pracy - tu pewną niejasność wprowadza pojawienie się wśród celów cząstkowych analizy regulatora Msmeg_5784, który nie został wymieniony w celu głównym. Rozdziały Materiały i Metody są niewątpliwie mocną stroną tej pracy, opisując bardzo dokładnie nie tylko podstawową metodologię, ale i strategię konstrukcji odpowiednich mutantów oraz systemów do nadekspresji genów, uzupełnione pomocnymi schematami. Wykaz szczepów i wektorów stosowanych w rozprawie jasno wskazuje na ogrom pracy włożonej w osiągnięcie zaplanowanych celów (tu chciałabym zapytać o genezę nietypowego określenia kolekcji mikroorganizmów jako "Sztok laboratoryjny"). Najobszerniejsza część rozprawy, rozdział Wyniki, opisuje krok po kroku poszczególne etapy pracy związanej z charakterystyką badanych potencjalnych białek regulatorowych prątków. Opisy doświadczeń są zilustrowane rycinami. Dwa największe zestawienia, wyniki analiz fenomicznych i transkryptomicznych zawarte są na załączonej płycie CD. Chciałam tu zauważyć, że trochę szkoda, iż wnioski z analiz macierzy fenotypowych zostały w pracy ograniczone do dość skrótowych wniosków - taka ilość zarejestrowanych zmian w różnych warunkach wzrostu byłaby warta przedstawienia w głównym tekście pracy w postaci tabelki z wybranymi efektami fenotypowymi, pogrupowanymi względem określonych procesów. Podobnie, analiza transkryptomu mutantów w genach badanych białek regulatorowych została - ze zrozumiałych z punktu widzenia danych literaturowych opisanych we wstępie - ograniczona głównie do tych związanych z głodem azotowym. Rozdział Dyskusja podsumowuje uzyskane wyniki w świetle dotychczas opublikowanych badań oraz zakładanych celów; poziom tej części pracy wskazuje na szeroką wiedzę i dojrzałość naukową Doktorantki.

Z obowiązku recenzenta chciałam zauważyć drobne błędy edytorskie, jak np. pewien skrót pojęciowy w określeniu "techniki CFU" czy umieszczanie części legendy rycin na następnej stronie. Jednakże, całościowo praca napisana jest ładnym językiem naukowym z zasługującą na podkreślenie dbałością o stronę redaktorską (bardzo niewiele błędów literowych).

Poprosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do kilku pytań i komentarzy dotyczących przedstawionych wyników i ich interpretacji:

- jakie były podstawy wyboru tych właśnie genów białek regulatorowych u prątków spośród innych, których funkcja nie jest znana?

- na jakiej podstawie stwierdzono czy badane białka można określić jako składniki systemów dwukomponentowych, dla których istnieją komórkowe kinazy? Nawet jeśli wykazują one podobieństwo do znanych komponentów regulatorowych tych układów, nie można wykluczyć, iż powstały one w efekcie duplikacji kodujących je genów i późniejszych zmian funkcjonalnych,

- czy znane są zmiany w poziomie ekspresji genów badanych regulatorów w czasie wzrostu bakterii (w różnych fazach wzrostu) i czy korelują z tymi zmianami poziomy odpowiednich białek? Jakie czynniki sigma odpowiadają za transkrypcję z promotorów tych genów?

- jakich wyników można by spodziewać się z analiz potencjalnego wiązania białek komórkowych z badanymi regulatorami stosując metodę pull-down z wykorzystaniem lizatów bakteryjnych zamiast oczyszczonych pojedynczych białek?

- przedstawione w rozprawie wyniki wskazują na zaangażowanie badanych białek regulatorowych w procesy związane ze stresem niedoboru azotu czy stresem oksydacyjnym. Jaka może być rola odpowiedzi ściślejszej w tych procesach oraz w działaniu tych białek?

W podsumowaniu niniejszej recenzji stwierdzam, iż wysoki poziom rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Antczak świadczy o bardzo dobrym wykorzystaniu zaplecza naukowego i doświadczenia zespołu i Promotorów rozprawy, co razem z sumienną i niewątpliwie niełatwą pracą dało w rezultacie bardzo dobry efekt. Dlatego, z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, iż rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim, wyszczególnione w Ustawie z dnia 18.03.2011 o stopniach naukowych i tytułach naukowych. W związku z tym, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Antczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakteri
A. Szalewska-Pałasz
prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz