

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

Gdańsk, 02.01.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Karoliny Ambroziak
„Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdtaS/PdtaR
w regulacji procesów metabolicznych u mykobakterii”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, jako podstawa ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora, została wykonana w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierunkiem promotora, Pana prof. dr hab. Jarosława Dziadka, oraz dr Renaty Płocińskiej jako promotora pomocniczego. Głównym celem rozprawy było zbadanie roli systemu PdtaS/PdtaR w procesach życiowych prątków. Tematyka ta jest istotna z uwagi na znaczenie systemów przenoszenia sygnału u bakterii. Komunikacja z otoczeniem jest bardzo istotną funkcją organizmów żywych. Umożliwia ona zwłaszcza prostym organizmom jednokomórkowym szybkie i odpowiednie reakcje na zmieniające się warunki zewnętrzne. Jest to ważne zwłaszcza u mikroorganizmów patogennych, u których przenoszenie sygnałów jest związane z stabilnością układu patogen-gospodarz, a również bezpośrednio z wirulencją bakterii. *Mycobacterium*

tuberculosis, będąca przedmiotem badań mgr Karoliny Ambroziak, stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego jako czynnik etiologiczny groźnej i rozpowszechnionej choroby, jaką jest gruźlica, dlatego poznanie działania systemów regulacji metabolizmu i ekspresji genów u tej bakterii jest istotne dla zarówno szeroko pojętej wiedzy mikrobiologicznej jak i dla zwiększenia możliwości zwalczania zakażeń *Mycobacterium*. W związku z tym podjęcie tego tematu jest ze wszech miar uzasadnione. Zwłaszcza, iż w swojej pracy Doktorantka mogła korzystać z bardzo szerokiej wiedzy i doświadczenia naukowego Promotorów pracy i całego zespołu Prof. dr hab. Jarosława Dziadka.

Rozprawa ma formę 134-stronicowej monografii, skonstruowanej w sposób typowy dla opracowań naukowych w pracach eksperymentalnych. Rozdział Wstęp wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy i przedstawia dotychczasowy stan wiedzy na temat systemów transdukcji sygnału u mykobakterii. Opis różnorodnych systemów transdukcji sygnału byłby jaśniejszy, gdyby został uzupełniony o tabelkę podsumowującą najważniejsze informacje. We wstępie opisana została epidemiologia *Mycobacterium* i mechanizmy działania antybiotyków stosowanych w leczeniu gruźlicy oraz oporności na te leki. Zabrakło jednakże szerszej informacji na temat zastosowanej we wszystkich etapach pracy bakterii modelowej, *Mycobacterium smegmatis*. Cel przedstawia szczegółowe etapy pracy – tu sformułowanie etapu 5 odbiega od pozostałych, w związku z czym przekaz tego etapu jest niejasny. Rozdział Materiały opisuje szczegółowo i poprawnie zastosowane odczynniki, a przede wszystkim wektory plazmidowe wraz z ich opisami, schematami i zastosowaniem. Metody stanowią bardzo dokładny opis zastosowanej metodologii, a zastosowane schematy ułatwiają zrozumienie etapów konstrukcji szczepów. Należy podkreślić, iż zestaw metod użytych w tej pracy świadczy o szerokim wykorzystaniu zarówno klasycznych mikrobiologicznych i genetycznych podejść doświadczalnych, jak i nowoczesnych technik wysokoprzepustowych, takich jak analiza macierzy fenotypowych oraz transkryptomika, co stanowi o znaczeniu i wiarygodności uzyskanych wyników. Rozdział Wyniki przedstawia poszczególne etapy pracy, czemu odpowiada podział na podrozdziały. Rezultaty poszczególnych doświadczeń są zilustrowane wykresami i fotografiami. Wyniki badań wysokoprzepustowych przedstawione są w postaci wybranych i przedyskutowanych czynników (fenomika) i genów (transkryptomika), gdzie zaobserwowane były największe zmiany. Pełne dane tych analiz załączone są na płycie CD jako suplement. Rozdział Wyniki skonstruowany jest jasno i logicznie, uwzględniając uzasadnienia podejmowania kolejnych podejść doświadczalnych. Jednakże, w

wielu podrozdziałach zabrakło podsumowania danego etapu pracy, co ułatwiłoby płynne przejście do następnych części pracy. Dyskusja umiejętnie i dojrzałe podsumowuje uzyskane wyniki i przedstawia je na tle wiedzy i hipotez wywodzących się z badań zarówno zespołu Prof. Dziadka, jak i innych ośrodków naukowych. Rozprawa jest zakończona przedstawieniem wniosków oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Spis pozycji literaturowych pozwala na stwierdzenie, iż Doktorantka posiada stosowną i aktualną wiedzę w badanej dziedzinie nauki i jest w stanie krytycznie odnieść się do własnych badań w kontekście dotychczasowej wiedzy. Praca zawiera także wykaz stosowanych skrótów oraz szczegółowy spis treści. Rozprawa napisana jest w zasadzie poprawnym i jasnym językiem naukowym, zauważyłam w niej nieliczne wyrażenia żargonowe: np. str 72 („sygnał transferowano na ekran”), nieliczne błędy edytorskie oraz jeden błąd ortograficzny (str 29, trehaloza zamiast trehaloza).

Badany system transdukcji sygnału składa się z dwóch komponentów: kinazy histydynowej PdtaS oraz białka regulatorowego PdtaR. Oba te białka i odpowiadające im geny zostały zidentyfikowane zarówno u *M. tuberculosis* jak i *M. smegmatis*, co umożliwiło badania z wykorzystaniem obydwóch gatunków bakterii. Interesująco, mimo ewolucyjnego konserwowania tych białek u prątków, wyniki rozprawy wskazują, iż kinaza PdtaS nie jest niezbędna dla przeżycia bakterii w standardowych warunkach wzrostu, jak również w wybranych warunkach stresowych (jak obecność reaktywnych form tlenu i azotu). Dlatego, uzasadnione były poszukiwania procesów metabolicznych, które mogłyby być kontrolowane przez system Pdta. **Chciałam tu zapytać, czy zdaniem Doktorantki, jest możliwe, iż białko regulatorowe PdtaR jest celem działania także innej kinazy odbierającej sygnały ze środowiska?** Analiza różnic w fenotypie między szczepem dzikim i mutantem wykazała zmiany w aktywności metabolicznej w obecności szeregu antybiotyków; na tej podstawie przeprowadzone zostały badania wrażliwości bakterii na te antybiotyki (z określeniem minimalnych stężeń hamujących wzrost) oraz przeżywalności w obecności tych leków. Przeprowadzone zostały także badania transkryptomyczne, które wykazały zbieżne z obserwowanymi w analizie fenotypowej zmiany w ekspresji genów związanych z opornością na antybiotyki, z wirulencją oraz budową rybosomów. Zmiany obserwowane były także w aktywności łańcucha oddechowego. Interesująco, mutanty *pdtaS* charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na antybiotyki aminoglikozydowe oraz zwiększoną opornością na tetracyklinę. Jako że celem działania tych związków są rybosomy bakteryjne, w rozprawie zostały zbadane możliwości wpływu systemu Pdta na maszynę translacyjną. Wykluczone zostało

oddziaływanie na syntezę rybosomalnych RNA, jednakże zaobserwowano zmiany w składzie białek rybosomalnych i proporcji między małą a dużą podjednostką rybosomu w szczepach pozbawionych PdtA5 co zostało wykazane jako podstawa zmienionej wrażliwości na antybiotyki. Co ciekawe, mutanty *pdtA5* wykazywały zwiększoną oporność na izoniazyd, antybiotyk stosowany powszechnie w terapii gruźlicy. Najprawdopodobniej spowodowane jest to zmniejszeniem aktywności katalazy w szczepie mutanta, będącej koniecznym elementem aktywacji izoniazidu – **jakie mogą być przypuszczalne mechanizmy działania systemu PdtA5 w regulacji aktywności katalazy?**

W pracy skonstruowano wektory dla nadprodukcji białek PdtA5 i PdtA6, przeprowadzono także ich oczyszczanie (wykorzystując znaczniki His i GST). Jednakże, jedyne doświadczenie jakie przeprowadzone zostało z udziałem oczyszczonych białek to badanie fosforylacji prowadzonej przez kinazę histydynową – co oczywiście było wartościowym wynikiem, jednakże wydawać by się mogło, iż dostępność tych białek pozwoli na znacznie szersze badania w układzie *in vitro*. **Czy takie badania są planowane?**

Efektywna reakcja na zmiany w środowisku u bakterii jest zazwyczaj związana z uruchomieniem odpowiedzi ściślej, będącej globalną reakcją stresową bakterii. Pojawia się zatem pytanie **czy znana lub możliwa jest rola tej odpowiedzi w modulacji działania systemów transdukcji sygnału i na czym ta rola mogłaby polegać.**

Biorąc pod uwagę przedstawione w rozprawie szczegółowe analizy zmian w metabolizmie bakterii spowodowanych brakiem funkcjonalnego białka PdtA5, chciałam zapytać, **jakie, zdaniem Doktorantki, może mieć znaczenie zwiększanie oporności na określone antybiotyki (jak izoniazyd) obserwowane w mutantach pozbawionych białka PdtA5, z ewolucyjnego punktu widzenia?** I czy spontaniczne pojawienie się takich mutantów może zwiększać zagrożenie nieskuteczności terapii antybiotykowej.

Podsumowując, praca przedstawia wyniki będące oryginalnym rozwiązaniem istotnego problemu naukowego, i jak to zazwyczaj w badaniach bywa, stawia kolejne pytania wymagające dalszych badań i odpowiedzi. Pani mgr Ambroziak przestawiła w swojej rozprawie umiejętnie poprowadzone badania wyjaśniające rolę jednego z systemów transdukcji sygnału u mykobakterii. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat funkcjonowania mechanizmów kontrolujących metabolizm prątków w odpowiedzi na warunki środowiska, co w dalszych badaniach może

przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów patogenezы mykobakterii oraz ułatwić pracę nad nowymi sposobami terapii zakażeń *M. tuberculosis*. Praca została wykonana prawidłowo i wskazuje na umiejętności Doktorantki zarówno w postawieniu pytań naukowych w oparciu o wiedzę teoretyczną, jak i realizacji zaplanowanych celów pracy. Dlatego, stwierdzam, iż przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami i uzupełnieniami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Zwracam się zatem z wnioskiem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Ambroziak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Ewelina Szalewska-Palaż

