

Dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz, prof. UG
Katedra Biologii Molekularnej
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 04.11.2014

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Anety Kuroń

„Prymaza DnaG jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych tuberkulostatyków”

Poszukiwania nowych możliwości leczenia chorób pochodzenia bakteryjnego jest obecnie ważną dziedziną badań mikrobiologicznych, szczególnie w świetle coraz częstszego występowania antybiotyko-oporności wśród bakterii oraz coraz mniejszą liczbą nowych substancji bakteriobójczych i bakteriostatycznych. Jest to istotne zwłaszcza dla bakterii powodujących choroby o szerokim zasięgu takie jak gruźlica stanowiących istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Dlatego bardzo istotne jest poznawanie specyfiki biochemii i metabolizmu chorobotwórczych bakterii, co prowadzi do określenia możliwych celów działania leków. Rozprawa doktorska mgr Anety Kuroń wpisuje się w ten bardzo aktualny nurt badań, podejmując próbę poszukiwania celów działania tuberkulostatyków wśród białek zaangażowanych w replikację DNA. Bardzo trafne uzasadnienie podjęcia przez Doktorantkę prac badawczych w kontekście zagrożenia gruźlicą i trudności w leczeniu zakażeń mykobakteriami zostało przez nią sformułowane w pierwszych akapitach rozdziału Dyskusja.

Praca doktorska Pani mgr Kuroń została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN pod kierunkiem Pana Profesora Jarosława Dziadka. W Pracowni tej prowadzone są od wielu lat szeroko zakrojone badania nad biochemią, genetyką, metabolizmem i patogenezą prątków, gdzie celem jest poznanie różnych aspektów

fizjologii tych bakterii umożliwiając zastosowanie nowych tarcz w specyficznej terapii zakażeń mykobakteriami. Rozprawa doktorska Pani Kuroń wpisuje się ściśle w zakres badań prowadzonych w pracowni, zaś poziom naukowy przedstawionej do oceny rozprawy świadczy, iż Doktorantka dobrze wykorzystała możliwości, jakie dała jej nauka i realizacja pracy doktorskiej w zespole o uznanym światowym dorobku naukowym.

Wymogiem koniecznym do spełnienia dla związków stosowanych dla hamowania rozwoju bakterii jest ich specyficzność wobec mikroorganizmów przy jednoczesnym braku szkodliwości dla komórek gospodarza, idealna zaś sytuacja zakłada specyfikę działania danego leku na określony rodzaj bakterii. Dlatego, trwające poszukiwania nowych leków opierają się na wykorzystaniu jako tarcz działania szlaków enzymatycznych, białek czy procesów charakterystycznych dla określonych mikroorganizmów. W przypadku mykobakterii potencjalnym i stosowanym celem działania leków są białka związane z ekspresją genów jak polimeraza RNA, enzymy biosyntezy ściany komórkowej, czy białka związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych. Ograniczone możliwości terapii gruźlicy (te same leki stosowane są od wielu lat) wraz z coraz powszechniejszym pojawianiem się bakterii lekoopornych i zwiększeniem zachorowań na gruźlicę było niewątpliwie ważnym argumentem uzasadniającym podjęcie się przez Doktorantkę tego zagadnienia i wniesienia własnego wkładu badawczego do tej tematyki. Zastosowanie skutecznych tuberkulostatyków działających na proces replikacji DNA jest atrakcyjnym podejściem doświadczalnym, gdyż proces powielania informacji genetycznej jest nieodzowny dla przeżycia każdego organizmu, w tym mikroorganizmu patogenego. W związku z tym, Doktorantka podjęła się próby charakterystyki prymazy mykobakterii w celu zbadania potencjalnego zastosowania tego białka jako celu dla działania bakteriostatyków. Prymaza jako niezbędny element maszynarii replikacyjnej, jest specyficzną polimerazą RNA syntetyzującą na matrycy DNA krótkie fragmenty RNA, startery procesu replikacji, w związku z czym jej aktywność jest wymagana podczas replikacji DNA zachodzącej zarówno na nici wiodącej jak i opóźnionej. W prezentowanej rozprawie, jasno sformułowane pytania badawcze prowadzą do logicznie przedstawionej w poszczególnych etapach pracy analizy - punkt po punkcie - możliwości zastosowania prymazy jako celu działania leków przeciwpłatkowych. Obejmują one zbadanie, czy białko DnaG jest niezbędne dla funkcjonowania mykobakterii, analizę specyficzności działania białka (do czego niezbędna była charakterystyka biochemiczna) oraz badanie działania na prymazę potencjalnych

tuberkulostatyków *in vitro*, jak również wpływu tych związków na wzrost bakterii *in vivo*. Modelem badawczym był niepatogenny prątek *Mycobacterium smegmatis*, zaś część badań dotycząca analizy białek i badania wrażliwości na zastosowane potencjalne leki, była prowadzona także przy udziale *Mycobacterium tuberculosis*.

Za główne -spośród wielu- osiągnięcia pracy doktorskiej Pani magister Anety Kuroń uważam:

- zastosowanie złożonego eleganckiego podejścia doświadczalnego z użyciem genetycznego modelu rekombinacji homologicznej i selekcji mutantów w celu odpowiedzi na pytanie, które z białek pełniących potencjalną funkcję prymaz są dla komórki niezbędne, czy działania białek DnaG pochodzących z różnych gatunków bakterii mogą się zastępować oraz czy białka z rodziny AEP mogą komplementować brak prymazy DnaG,
- stwierdzenie, iż funkcjonalne białko DnaG jest niezbędne do przeżycia mykobakterii,
- oczyszczenie białek DnaG *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, co dało narzędzie do badań biochemicznych prymaz mykobakterii i umożliwiło otrzymanie przeciwciał,
- analiza aktywności białek DnaG *in vitro*, w tym możliwości syntezy starterów RNA, wiązania z matrycą DNA, zależności od jonów dwuwartościowych (Mn, Mg), ustalenia sekwencji DNA rozpoznawanej przez prymazę,
- wykazanie hamującego działania doksorubicyny na aktywność prymazy oraz na wzrost mykobakterii.

Wnioski zaprezentowane w rozprawie zostały właściwie udokumentowane dobrze zaplanowanymi, przeprowadzonymi i przeanalizowanymi doświadczeniami. Staranie dobrana metodyka obejmująca zastosowanie szeregu nowoczesnych technik genetyki i biologii molekularnej oraz różnorodnych wektorów i konstruktyw plazmidowych nie pozostawia wątpliwości dla celowości użycia określonych podejść doświadczalnych. Doktorantka wywiązała się świetnie z niełatwego zadania przedstawienia bardzo obszernego materiału badawczego, w czym bardzo pomocne było utrzymywanie konwencji każdego podrozdziału rozpoczynającego się sformułowaniem celu danych eksperymentów, a kończącego się zwięzłym podsumowaniem, ułatwiającym znacząco czytelnikowi nawigację w skomplikowanych zbiorach danych.

Poniżej przedstawiam kilka uwag i pytań odnoszących się do części eksperymentalnej pracy:

1. Spośród kilku wytypowanych potencjalnych inhibitorów prymazy, doksorubicyna wykazywała hamowanie wzrostu *Mycobacterium*. Jaki jest zakres działania tego związku na inne bakterie i czy stanowiłoby to problem w ewentualnym zastosowaniu doksorubicyny w terapii gruźlicy?

2. W badaniu działania prymazy *E. coli in vitro* zastosowanie helikazy DnaB zmieniło istotnie profil syntezy starterów RNA. Czy zastosowanie białka DnaB *Mycobacterium* w analogicznych reakcjach mogłoby spowodować różnice w np. specyficzności względem sekwencji consensus matrycy lub zależności od jonów dwuwartościowych?

3. Poziom ekspresji genów prim 2, 3 i 4 badany był metoda ilościowego PCR - jednakże dla działania produktów tych genów istotna byłaby wiedza na temat poziomów nadprodukowanych białek, gdyż można by na przykład założyć, iż zmiany w wydajności translacji spowodują, iż faktyczny poziom białek będzie niższy niż zakładany na podstawie badań transkrypcji genów.

4. W niektórych konstrukcjach i klonowaniach uzyskiwano fragment DNA przy pomocy reakcji PCR. Powstałe produkty klonowania były sprawdzane analizą restrykcyjną, co nie wyklucza możliwości pojawienia się błędu w amplifikowanej sekwencji; w tej sytuacji lepszą metodą weryfikacji uzyskanego plazmidu byłoby sekwencjonowanie DNA.

5. Nadprodukowano rekombinowane białka DnaG zawierają znaczniki (tagi): histydynowy i transferazę glutationu. Czy obecność tych dodatkowych reszt aminokwasowych nie wpływa na konformacje i aktywność badanych białek i czy rozważana była możliwość usunięcia dodatkowych reszt po oczyszczeniu białek?

6. Pokazane zostało, iż doksorubicyna hamuje wzrost bakterii. Czy temu zahamowaniu towarzyszy inhibicja syntezy DNA i RNA? Jakie było minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) dla doksorubicyny?

Rozprawa Pani Kuroń ma poprawny, typowy dla rozprawy doktorskiej opartej na pracy eksperymentalnej układ. 27-stronicowy Wstęp wprowadza w aktualny stan wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, ich patogenezy, rozpowszechnienia oraz białek pełniących

funkcje prymazu u bakterii. Rozdział ten napisany jest kompetentnie a przy tym zwięźle, dobór najważniejszych dla zrozumienia tematyki rozprawy wiadomości został dokonany właściwie. Cel pracy określony jasno i prawidłowo, został on uzupełniony szczegółowymi etapami pracy podanymi w punktach, co ułatwia zapoznawanie się ze sposobami realizacji głównego zamierzenia pracy. Rozdziały Materiały (28 stron) i Metody (25 stron) zawierają dokładne opisy stosowanych szczepów, plazmidów, konstruktów, primerów i metod, W tych rozdziałach zwraca uwagę szeroki dobór i zakres technik oraz odczynników zastosowanych w pracy, jak również niezwykła staranność i dbałość o szczegóły w opisach metod - rozdział ten może służyć jako podręcznik metodyki dla innych studentów i doktorantów w pracowni. Podkreślić należy także szczegółowo opisane metody zarówno klonowań jak i konstrukcji i selekcji odpowiednich szczepów po rekombinacji homologicznej, szczególnie pomocne w zrozumieniu podejścia doświadczalnego zastosowanego w pracy są dobrze dobrane schematy. Rozdział Wyniki zajmujący 47 stron przedstawia usystematyzowane w jasno określonych i zatytułowanych podrozdziałach podejście doświadczalne potrzebne do realizacji celów postawionych w rozprawie, w tym konstrukcję układu doświadczalnego warunkowych mutantów w genach kodujących prymazy, nadprodukcję i oczyszczanie prymaz, badanie ich aktywności oraz wrażliwości mykobakterii na związki działające na prymazy. Rozdział ten wraz z poprzednimi (Materiały, Metody) wskazuje wyraźnie, iż Doktorantka opanowała i zastosowała szeroki warsztat badawczy. W zwięzłym rozdziale Dyskusja (12 stron) Pani Kuroń przedstawiła syntezę wniosków ze swoich obszernych badań w kontekście prac z innych ośrodków; o dojrzałości naukowej Doktorantki świadczy dobrze opracowana dyskusja dotychczasowych wyników oraz perspektyw dalszych badań, trudności i pozostałych do rozwiązania problemów w temacie pracy. Mam jedną uwagę do tego rozdziału: opis badań oddziaływań prymazy i matryc DNA o różnych długościach (Ryc 6.2) powinien znaleźć się w rozdziale Wyniki. W rozprawie cytowanych jest ponad 150 pozycji z tematyki dotyczącej badanych zagadnień, co wskazuje na szeroki zakres wiedzy Doktorantki zarówno w zakresie biologii i patogenności *Mycobacterium* jak i replikacji DNA oraz biochemii białek. Zamykające rozprawę rozdziały Wnioski i Streszczenie jasno i precyzyjnie podsumowują uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Jest to bardzo istotne z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych prac doświadczalnych i świadczy o umiejętności Doktorantki syntetycznego podsumowania własnej pracy.

Rozprawa doktorska Pani Kuroń jest odpowiednio zredagowana i napisana poprawnym językiem naukowym. Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych błędów językowych wynikających m. in. ze stosowania skrótów pochodzących z żargonu laboratoryjnego, jak np. "hamowanie limfocytów", str. 2, "w górę od genu" i "sekwencja kodująca sygnał" na str 21, "skrining", str 24, "temperatura mięknienia starterów", str 59, "płytką titracyjną", str 82, czy niejasnych lub nieprawidłowych sformułowań np. "Uzyskany produkt łączono do wektora", str. 89. Jednakże, podkreślić należy, iż błędy te są nieliczne a praca napisana jest starannie z dbałością o jasność przekazu i ilustracji. Przedstawione zaś uwagi nie umniejszają znaczącej merytorycznej wartości pracy.

Dla całościowego obrazu oceny pracy Pani Kuroń istotne jest, iż część rezultatów prezentowanych w rozprawie doktorskiej została już oceniona i zaakceptowana przez ekspertów, stając się podstawą pracy oryginalnej (w której Doktorantka jest pierwszym autorem), opublikowanej w *Antimicrob Agents Chemother* w 2014 roku. Ponadto Pani Kuroń jest współautorką innej pracy oryginalnej o pokrewnej tematyce, opublikowanej w *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* także w 2014 roku.

Czas realizacji pracy doktorskiej jest z założenia poświęcony dwom głównym celom - zrealizowaniu przy udziale różnorodnej metodologii zadań eksperymentalnych pozwalających na zweryfikowanie postawionej na wstępie pracy hipotezy oraz zdobyciu odpowiedniej wiedzy i umiejętności pozwalających na wyciągnięcie wniosków i zaprezentowanie osiągnięć własnej pracy. W przypadku Pani Anety Kuroń, oba te cele zostały zrealizowane, czego dowodem jest rozprawa doktorska o wysokich walorach naukowych, w której część doświadczalna została zaplanowana i zrealizowana ambitnie i starannie, zaś forma prezentacji rozprawy świadczy o wysokich umiejętnościach Doktorantki w przygotowaniu tekstu naukowego. Dlatego, stwierdzam z pełnym przekonaniem, iż rozprawa doktorska Pani mgr Anety Kuroń spełnia więcej niż satysfakcjonująco wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim. Rozprawa posiada wysokie walory poznawcze, a przedstawione w niej wyniki stanowią znaczący wkład w wiedzę na temat roli białek o własnościach prymaz mykobakterii i możliwości zastosowania ich jako celu działania leków. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Anety Kuroń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową pracy, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.