



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

dziekanat.wb@uwr.edu.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl

Wrocław 21.12.2023

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz
Z-d Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski
dagmara.jakimowicz@uwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Filipa Gąsiora pod tytułem „Analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawy DNA – Msmeg_1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju *Mycobacterium*.”

Naprawa uszkodzeń DNA zapewnia kluczowe dla przeżycia każdej komórki utrzymanie stabilności genomu a ekspozycja bakterii na czynniki genotoksyczne jest jednym z mechanizmów obrony gospodarza podczas infekcji. Poznanie procesów naprawy DNA u patogennych prątków ma ogromne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów zapewniających tym bakteriom skuteczne uniknięcie systemu odpornościowego. Wiedza dotycząca tych mechanizmów może umożliwić opracowanie metod ich hamowania, a tym samym skuteczniejszego zwalczania infekcji. W związku z powyższym podjęty przez mgra Filipa Gąsiora temat pracy doktorskiej dotyczący naprawy DNA u *Mycobacterium* jest niezwykle istotny z naukowego i medycznego punktu widzenia. Recenzowana praca została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytucie Biologii Medycznej, PAN w Łodzi pod opieką dr hab. Anny Brzostek prof. IBM PAN oraz dr Przemysława Płocińskiego jako promotora pomocniczego. Tematyka pracy nawiązuje do wcześniejszych badań prowadzonych przez dr hab. Annę Brzostek i dr Przemysława Płocińskiego. Praca doktorska zmierzała do poznania roli białka Msmeg_1891 zidentyfikowanego wcześniej jako rozpoznające



uszkodzenia DNA. W ramach charakterystyki funkcjonalnej białka Msmeg_1891 mgr Filip Gąsior uzyskał szereg ciekawych wyników. Za najważniejsze osiągnięcia Doktoranta uważam:

- wykazanie, że obniżony poziom białka Msmeg_1891 powoduje zwiększenie wrażliwości prątków na metylosulfonian metylu,
- udowodnienie, że białko Msmeg_1891 wiąże się do fragmentów DNA zawierających niesprawowane nukleotydy i wprowadza nacięcia w nici DNA,
- wykrycie indukcji ekspresji genu *msmeg_1891* w odpowiedzi na potraktowanie komórek *M. smegmatis* czynnikiem genotoksycznym,
- identyfikacja potencjalnych parterów białkowych Msmeg_1891.

Rozprawa doktorska mgr Filipa Gąsiora ma klasyczny układ i składa się z rozdziałów typowych dla prac eksperymentalnych. We Wstępie Doktorant przedstawił bakterie rodzaju *Mycobacterium* oraz omówił szczegółowo mechanizmy naprawy DNA, z przedstawieniem białek biorących udział w opisywanych procesach i ze szczególnym uwzględnieniem występowania danego procesu oraz homologów białek biorących w nim udział u prątków. Wstęp jest moim zdaniem dobrze przemyślany i zawiera wszystkie informacje niezbędne dla wprowadzenia do tematyki pracy. Rozdział ten jest opatrzonej eleganckimi ilustracjami – rysunki są staranne i czytelne, jedyne wskazówki jakie chciałabym zgłosić do Wstępu to sugestia, aby na rysunkach umieszczać legendy, a w diagramie Venna przedstawiającym regulony LexA i PafBC (rys 2.6) podać liczby regulowanych genów.

Cel pracy jest klarowny i zwięzły, wyodrębniono też cele cząstkowe. Rozdział Materiały zawiera poprawne zestawienia wykorzystywanych w pracy szczepów bakteryjnych, oligonukleotydów, plazmidów, enzymów oraz buforów, w większości zebranych w czytelnych tabelach. Rozdział Metody w poprawny sposób przedstawia stosowane procedury, są one skatalogowane jako techniki pracy z DNA (obejmujące przygotowanie wektorów), techniki pracy z RNA, techniki wykorzystywane do pracy z białkami oraz analizy fenotypowe zmodyfikowanych szczepów *Mycobacterium*. Zawartość tego rozdziału obrazuje szeroki zakres stosowanych technik.

Wyniki uzyskane w ramach pracy opisano w 8 podrozdziałach. W ramach projektu Doktorant umiejętnie połączył analizy fenotypowe skonstruowanych szczepów z bardzo szerokim spektrum analiz biochemicznych oczyszczonego białka MSMEG_1891. Zbadano

wpływ obniżenia poziomu *msmeg1891* u *M. smegmatis* oraz jego delekcji w tle genetycznym szczepu dzikiego oraz w połączeniu z mutacjami w genach kodujących białka związane z naprawą DNA na przeżywalność w obecności czynników genotoksycznych. W kolejnym etapie pracy Doktorant podjął się oczyszczania zrekombinowanego białka Msmeg_1891 i zbadania jego wiązania oraz aktywności nukleolitycznej względem szeregu starannie zaprojektowanych substratów oraz w różnych warunkach reakcji. Badania wzbogacone są analizami oddziaływań Msmeg_1891 - typu *pull-down* oraz analizami transkryptomocznymi zmodyfikowanych szczepów poddanych ekspozycji na MMS. Eksperymenty są zaplanowane i przeprowadzone w przemyślny sposób, stanowią logiczną całość, nie brakuje odpowiednich kontroli, wyniki są starannie udokumentowane.

Dyskusja podsumowuje dokładnie uzyskane wyniki, być może nieco je powtarzając. Nie zabrakło jednak w Dyskusji szerszego podsumowania, wniosków i propozycji dalszych eksperymentów. Warto zaznaczyć, że praca została przygotowana w oparciu o 100 pozycji literaturowych, co świadczy o doskonałym rozeznaniu Doktoranta w tematyce pracy.

Lektura pracy nasunęła mi szereg pytań, najczęściej wynikających z niepełnych informacji zawartych w rozdziale Wyniki. Proszę zatem Doktoranta o wyjaśnienie w czasie publicznej obrony następujących kwestii.

- Wyniki rozpoczynają się od stwierdzenia, że białko Msmeg_1891 jest zdolne do wiązania się z substratami przypominającymi pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA. Zaintrygowała mnie ta informacja i bardzo proszę o wyjaśnienie, co się kryje za sformułowaniem „przypominający pojedyncze lub podwójne pęknięcia nici DNA”.

- Zabrakło mi informacji o optymalizacji systemu CRIPRi/dCas. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie, czy sprawdzano różne sekwencje sgRNA/ sekwencje PAM, czy testowano różne poziomy indukcji anhydrotetracykliną i czy weryfikowano obniżenie poziomu ekspresji na poziomie transkryptu? Informacja o potwierdzeniu obniżonego poziomu w szczepie Msmeg_1891 CRIPRi/dCas byłaby przydatna przed opisem jego analiz fenotypowych (przedstawionych na rys. 5.8, podczas gdy obniżenie poziomu Msmeg_1891 jest udokumentowane na rys. 5.11). Bardzo cenna byłaby informacja o położeniu sekwencji PAM względem początku genu, wskazane byłoby zaznaczenie PAM na rysunku, dobrze byłoby też pokazać otoczenie genowe *msmeg_1891*. Czy sprawdzano, czy system CRIPRi/dCas mógłby wpłynąć na ekspresję genu poniżej?

- Co ciekawe szczepy z podwójnymi mutacjami nie wykazywały zwiększonej wrażliwości na testowane czynniki genetykowskie. Czy oczekiwano, że szczepy z mutacjami w genach, których produkty uczestniczą w naprawie (*ku*, *ligD*, *ligC1C2*) będą bardziej wrażliwe na testowane czynniki? W dyskusji zabrakło mi nieco przedyskutowania efektu delecji *Msmeg_1891* w różnych tłach genetycznych. Chciałabym prosić o komentarz tej obserwacji.

- Oczyszczanie białka - w rozdziale Wyniki nie pokazano optymalizacji indukcji, wspomniano natomiast, że do nadekspresji użyto dwóch szczepów *E. coli*. Nasuwa to pytanie, czy w obydwu szczepach optymalizowano ekspresję, czy te same warunki były optymalne dla obydwu szczepów? Wspomniano również o przygotowaniu konstruktów z metką His na obu końcach białka, nie znalazłam jednak wzmianki o tym, czy optymalizowano nadekspresję dla obydwu konstruktów? Czy ostatecznie zdecydowano się na metkę His na C-końcu białka ze względu na potrzebę zachowania niezmodyfikowanego N-końca białka? Nie doszukałam się informacji ilości uzyskanego białka - jaka była wydajność oczyszczania *Msmeg_1891*?

- Wiązanie białka do różnych fragmentów DNA – na rys 5.14 zaznaczono, że przecięcie nici następuje w przypadku jednego substratu – dU, ale podobne produkty są też widoczne dla innych substratów – rCa, rAA, dlaczego zatem właśnie dU wybrano do dalszych analiz?

- Analiza wiązania przy pomocy termoforezy – zabrakło pokazania surowych danych i wyjaśnienia dlaczego w termoforezie zastosowano jednoniciowe a nie dwuniciowe DNA jak stosowane we wcześniej opisywanych eksperymentach? Przy okazji warto napomknąć, że warunki tego eksperymentu powinny być opisane w Metodach nie w Wynikach.

- Nadprodukcja białka w komórkach *M. smegmatis* – czy uzyskana duża nadprodukcja białka *Msmeg_1891* nie miała wpływu na wzrost szczepu *M. smegmatis*? Czy sprawdzano wrażliwość szczepu nadprodukcującego *Msmeg_1891* na MMS?

- Zwiększenie poziomu białka *Msmeg_1891* po traktowaniu MMS – widać wyraźny wzrost transkryptu, ale zmiany te nie w pełni odpowiadają zmianom poziomu białka. Czy Doktorant mógłby zaproponować wyjaśnienie tego zjawiska? Czy sprawdzano, czy wzrost poziomu transkryptu jest zależny od system *ImuA'*, *ImuB* wspomnianego we Wstępie jako alternatywny do odpowiedzi SOS opartej o białko *LexA*?

- Zaciekała mnie nazwa białek SRAP, która wskazuje na ich aktywność proteolityczną. Jak wspomniano, naprawa DNA miałyby się odbywać w powiązaniu z autoproteolizą sprzężoną z aktywacją nukleazy – czy w przypadku badanego białka sprawdzano zdolność autoproteolizy?

Należy mieć na uwadze, że powyższe pytania nie podważają w najmniejszym stopniu mojego przekonania o bardzo wysokim poziomie naukowym uzyskanych wyników. Mają one raczej na celu wyjaśnienie pewnych niedopowiedzeń i zaspokojenie ciekawości recenzenta.

Edytorska strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Szczególną uwagę zwraca bardzo staranne przygotowanie rysunków, warto byłoby jednak zwrócić uwagę, aby podpisy były bezpośrednio pod rysunkami. Drobne uwagi edytorskie co do rozdziału Wyniki dotyczą Tabeli 5.1 i 5.2, gdzie nie opisano, co oznacza wartość w kolumnie 2 i 3, nie jest też nigdzie rozwinięty skrót FDR pojawiający się w tabelach w opisie rys. 5.22. Natomiast w opisie do rys. 5.10 zabrakło informacji, jaka była ilość oczyszczonych białka naniesiona na żel i jaka całkowita ilość białka w lizacie – taka informacja byłaby przydatna dla oszacowania czułości przeciwciała. W pracy pojawiają się nieliczne żargonowe lub niewłaściwe sformułowania (np. str 69 - plazmid z obniżonym poziomem ekspresji, s. 95 - sformułowanie “biomasę dezintegrowano i oczyszczono”). Pomimo powyższych uwag i pytań nie mam żadnych wątpliwości co do wysokiego poziomu pracy doktorskiej, umiejętność Doktoranta prowadzenia badań naukowych oraz ich rzetelnego opisu nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Filipa Gąsiora w znaczący sposób poszerza wiedzę na funkcji biologicznej białka Msmeg_1891 u *Mycobacterium*. Bardzo ważnym i cennym aspektem pracy jest umiejętne połączenie szeroko zakrojonych badań aktywności białka Msmeg_1891 *in vitro* oraz różnorodnych analiz *in vivo* zmodyfikowanych szczepów *Mycobacterium*. **Uważam zatem, że rozprawa doktorska mgr Filipa Gąsiora stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i jasno wskazuje, że Doktorant nabył wiedzę teoretyczną w tematyce rozprawy oraz umiejętności prowadzenia pracy naukowej.** Biorąc powyższe pod uwagę, potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Filipa Gąsiora spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w artyku 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN o dopuszczenie mgr Filipa Gąsiora do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne.

