

Łódź, 03.01.2024 r.

dr hab. Paweł Stączek, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Molekularnej

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

Przedłożona mi do oceny praca doktorska autorstwa mgr. Filipa Gąsiora, studenta Szkoły Doktorskiej BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierunkiem dr hab. Anny Brzostek, prof. IBM PAN jako promotora oraz dr. Przemysława Płocińskiego z Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, jako promotora pomocniczego.

Przedmiotem rozprawy było poznanie funkcji dwóch białek należących do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (ang. *SOS-response associated peptidases*), tj. Msmeg_1891, występującego w komórkach szybkorosnących prątków z gatunku *Mycobacterium smegmatis* (wg nowej nomenklatury *Mycolicibacterium smegmatis*) oraz jego homologa pochodzącego z komórek prątków gruźlicy (*M. tuberculosis*) – Rv3226c. Tego typu białka są słabo poznane w komórkach prokariotycznych, jednakże dostępne dane wskazują na możliwość ich zaangażowania w procesach naprawy uszkodzeń DNA. Kwasooporne prątki, w tym m.in. szczególnie silnie patogenny *M. tuberculosis*, ale także *M. smegmatis* będący modelowym gatunkiem w badaniach nad prątkami, nadal nie są w pełni poznane pod kątem czynników oraz mechanizmów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA. Te procesy są kluczowe dla zachowania integralności genomów drobnoustrojów, a ich sprawny przebieg może pozwalać na przetrwanie w skrajnie niekorzystnych warunkach, w tym także podczas działania związków o charakterze przeciwbakteryjnym. Dlatego też, obok wysokich walorów poznawczych, scharakteryzowanie funkcji badanych białek może wnosić także potencjał aplikacyjny, jeśli okazałoby się, że odgrywając istotną rolę w fizjologii prątków, białka te mogą stanowić interesujący cel molekularny dla potencjalnych leków przeciwgruźliczych. Stąd też uważam podjęcie wskazanej tematyki za w pełni uzasadnione.

Podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie nauk medycznych jest monografia przygotowana w układzie klasycznym dla tego typu prac, obejmująca *Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i stwierdzenia końcowe*, streszczenia w języku polskim

i angielskim oraz *Literaturę*. Dodatkowo Doktorant zamieścił w niej spis swojego dorobku publikacyjnego obejmującego współautorstwo w czterech artykułach zamieszczonych w czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku wpływu (IF) równym 20,715 i 480 pkt MEiN.

Część teoretyczna pracy została zawarta w 18-stronnicowym *Wstępie* obejmującym bardzo krótką, ogólną charakterystykę rodzaju *Mycobacterium* oraz opisy najważniejszych mechanizmów naprawy DNA u przedstawicieli tego rodzaju, uzupełnione o informacje na temat peptydaz z grupy SRAP. Wydaje mi się, że w nawiązaniu do realizowanych w pracy badań, po charakterystyce rodzaju *Mycobacterium*, można było najpierw skupić się na białkach SRAP, a potem przejść do omówienia mechanizmów naprawczych, w których te białka mogą być zaangażowane, ale jest to kwestia, którą poddaję tylko Doktorantowi do rozważenia w kontekście przygotowywania ewentualnej publikacji. Mam natomiast pewne zastrzeżenia dotyczące sposobu graficznej prezentacji opisywanych mechanizmów naprawczych. Wszystkie zamieszczone w tej części ryciny zyskałyby na czytelności, gdyby zostały opatrzone bardziej szczegółowymi legendami, lub gdyby na zastosowanych kształtach symbolizujących białka znalazłyby się ich nazwy. W przypadku Ryc. 2.3, zatytułowanej „Schemat naprawy DNA przez wycinanie nukleotydu u *Mycobacterium*” przedstawiono mechanizm w jego wersji znanej dla *Escherichia coli*, tymczasem, jak sam Autor wskazuje w tekście na str.18, od 2020 r. wiadomo, że przebieg tego procesu u prątków wygląda inaczej. W przypadku Ryc. 2.4, prezentującej schemat naprawy NHEJ, prosiłbym o wyjaśnienie, skąd wzięła się zmiana sekwencji końców DNA po przyłączeniu się do nich białka Ku. Rycina 2.5 może być przez czytelnika interpretowana na wiele sposobów, szczególnie w kontekście łączników Holliday’a (to od nazwiska pisanego Holliday, nie Holiday, jak jest używane w tekście), w których widzimy cztery jednoniciowe końce, których pochodzenie pozostało niewyjaśnione. Z kolei na Ryc. 2.6 przedstawiono prawdopodobnie represor LexA blokujący przemieszczanie się polimerazy RNA (tak przynajmniej interpretuję kończącą się w połowie rysunku strzałkę). Jednakże miejsca wiązania LexA, tzw. *SOS-boxes*, znajdują się w obrębie regionów promotorowych, o czym zresztą doktorant pisze na str. 25, zatem obecność represora blokuje dostęp polimerazy RNA do promotora, a nie jej przemieszczanie się. Moje zaciekawienie z kolei wzbudziło sformułowanie ze str. 30 „substraty DNA przypominające pojedyncze i podwójne pęknięcia nici”. Czy mógłbym prosić o krótką charakterystykę takich substratów?

Cel pracy został wskazany prawidłowo, a jego osiągnięcie zaplanowano poprzez realizację ośmiu ambitnych celów cząstkowych.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wykorzystanie bardzo obszernego materiału badawczego, w tym dużej liczby narzędzi genetycznych w postaci prawidłowo zaprojektowanych starterów, sond genetycznych, wektorów, a także skonstruowanych przy ich pomocy szczepów bakteryjnych służących jako świetnie przemyślane modele doświadczalne. Podobnie imponująco wygląda przegląd metod badawczych, których opanowanie wymagało niewątpliwie od Doktoranta dużego zaangażowania i sporych umiejętności. Tego typu szeroki warsztat badawczy cechuje doświadczonych

eksperymentatorów. Moje drobne uwagi odnośnie tego rozdziału pracy dotyczą ponownie czytelności przedstawianych schematów, np. na Ryc. 4.2 wektor pMV306km nie powinien być produktem trawienia wektora pJet1.2/blunt enzymami XbaI/HindIII, co sugeruje strzałka opisana jako przekształcenie C, z kolei Ryc. 4.3. sugeruje klonowanie jednoniciowego fragmentu do wektora plazmidowego. Myślę, że warto byłoby sprecyzować, jakiego typu enzymem trawiono DNA przed hybrydyzacją typu Southern blot (str. 71), ponieważ dla mniej obeznanego czytelnika ta kwestia może być niejasna. Chciałbym także podjąć z Doktorantem dyskusję na temat arbitralnego wyboru *sigA* jako genu referencyjnego w badaniach nad poziomem transkrypcji innych genów. W wielu publikacjach wskazuje się bowiem, że mimo powszechnego *consensusu* co do wykorzystywania niektórych genów, najczęściej tych należących do grupy tzw. *housekeeping genes*, jako genów referencyjnych, przy bardziej wnikliwych analizach okazywało się, że wiele z nich nie spełnia odpowiednich wymogów w konkretnych warunkach prowadzenia eksperymentu. Jednymi ze sztandarowych przykładów mogą być ludzkie geny ACTB czy GAPDH, które przez lata były standardowo używane jako geny referencyjne, dopóki nie wykazano, że ich poziom ekspresji może podlegać znacznej zmienności w określonych warunkach czy tkankach. Prosiłbym zatem o dokonanie podczas obrony przeglądu obecnie dostępnych metod normalizacji i walidacji genów referencyjnych, stosowanych podczas analiz ekspresji z użyciem technik qPCR, czy mikromacierzy.

Rozdział *Wyniki* obejmuje opisy bardzo dobrze zaprojektowanych i stanowiących logiczną całość eksperymentów. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo ważny i znakomicie zaplanowany etap polegający na konstrukcji serii modelowych szczepów badawczych oraz weryfikacji ich poprawności. Zawsze bardzo cenię badania, które nie polegają jedynie na obserwacjach badanych komórek w określonych warunkach eksperymentalnych, ale opierają się na głęboko przemyślanych i samodzielnie przygotowanych modelach, skonstruowanych przy pomocy techniki rekombinacji DNA *in vitro*. Takie podejście miało również miejsce w przypadku recenzowanej pracy doktorskiej, dzięki czemu uzyskano mutanty pozbawione zdolności ekspresji badanych proteaz Msmeg_1981, Rv3226c pojedynczo, bądź w kombinacji z delecjami w obrębie genów kodujących wybrane białka zaangażowane w naprawy DNA. Dysponując takim zestawem, Doktorant przeprowadził analizy przesiewowe mające na celu zbadanie udziału tych proteaz w odpowiedzi komórek *Mycobacterium* na różnorodne czynniki uszkadzające DNA. Wykazał, że jedynie w przypadku zastosowania metanosulfonianu metylowego (MMS), szczepy *Mycobacterium* pozbawione odpowiednio białka Msmeg_1981 lub Rv3226c, wykazywały się istotną wrażliwością na ten czynnik genotoksyczny, przy czym żadna z dodatkowych mutacji nie wzmagała obserwowanego fenotypu. Wrażliwość na MMS została potwierdzona z użyciem kolejnego szczepu, tym razem wykazującego się jedynie obniżoną ekspresją białka Msmeg_1981. Dalsze badania były prowadzone z użyciem rekombinowanego białka Msmeg_1981, które zostało poddane przez Doktoranta nadekspresji, a następnie oczyszczone z użyciem chromatografii metalopowinowactwa i wykorzystane w eksperymentach z udziałem specyficznych substratów, jak również przekazane podmiotowi

zewnętrznemu celem uzyskania poliwalentnej surowicy stosowanej w immunodetekcji do oznaczeń jakościowych i ilościowych. Dzięki dysponowaniu oczyszczonym preparatem Msmeg_1981 możliwe było wykazanie specyficzności substratowej wobec jednoniciowych cząsteczek DNA oraz RNA, zarówno poprzez wykorzystanie testu spowolnienia migracji w żelu agarozowym (EMSA), jak i podczas rozdzielania elektroforetycznego w warunkach denaturujących, ciekawie zaprojektowanych dwuniciowych substratów zawierających błędnie sparowane rybonukleotydy bądź deoksyurydynę. Zaobserwowano, że badane białko wykazywało najsilniejszą aktywność wobec substratu zawierającego deoksyurydynę, prowadząc do jej wycięcia co upodabnia je do znanego enzymu zaangażowanego w wycinanie uracylu z dwuniciowych substratów DNA – glikozylazy uracylo-DNA. Ta aktywność Msmeg_1981 została także potwierdzona w pomiarze siły jego oddziaływania z substratami DNA, przeprowadzonego z użyciem metody termoforezy kapilarnej. W dalszej części swojej pracy Doktorant dokonał poszukiwań białek oddziałujących z Msmeg_1981, używając go jako tzw. przynęty w procesie współczyszczania białek partnerskich i ich identyfikacji z wykorzystaniem wysokosprawnej spektrometrii mas (ten ostatni etap został wykonany w komercyjnym laboratorium). Etap ten miał na celu zidentyfikowanie ewentualnych szlaków naprawczych, w których mogą być zaangażowane badane homologii SRAP. Dzięki przeprowadzonej analizie bioinformatycznej uzyskanych wyników, udało się zidentyfikować dwie helikazy oraz egzonukleazę, jednakże badania w tym kierunku nie zostały zakończone ze względu na ograniczone ramy czasowe realizacji pracy doktorskiej. Niemniej jest to bardzo ciekawy wynik, który otwiera perspektywę dalszych interesujących odkryć.

W ostatniej części swojej pracy eksperymentalnej mgr Filip Gąsior skupił się na badaniu ekspresji genów *M. smegmatis* w odpowiedzi na działanie czynnika metylującego DNA w postaci MMS. W pierwszej kolejności analizie poddał gen *msmeg_1981*, zarówno na poziomie transkryptu (techniką RT-qPCR), jak i produktu białkowego (techniką Western blot), wykazując faktycznie istotny wzrost jego ekspresji w obecności MMS. Następnie przeprowadził kompleksowe analizy porównawcze z użyciem techniki RNA-seq, mające na celu prześledzenie odpowiedzi na działanie MMS na poziomie transkryptomu, u szczepu *M. tuberculosis* pozbawionego zdolności do syntezy proteazy Rv3226c oraz u jego odpowiednika w postaci szczepu typu dzikiego. Co zaskakujące, pomimo, że różnice w poziomie ekspresji wielu genów przed i po dodaniu tego związku metylującego były widoczne dla każdego z tych szczepów indywidualnie, nie zaobserwowano znaczących rozbieżności pomiędzy profilami ekspresji szczepu dzikiego i mutantu delecyjnego, zarówno w obecności, jak i bez dodatku MMS. Wśród tych dość nielicznych genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję w analizowanych warunkach, zidentyfikowano takie, których funkcja nie jest związana bezpośrednio z mechanizmami naprawy lub też nie została jeszcze w ogóle poznana.

Pomimo braku wiążących odpowiedzi, jak nieobecność białka Rv3226c wpływa na ekspresję genów *M. tuberculosis* w warunkach uszkodzeń DNA wywołanych obecnością MMS, uważam wszystkie uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej wyniki za bardzo cenne i wnoszące wiele nowej wiedzy na

temat funkcjonowania mechanizmów naprawczych w komórkach *Mycobacterium*, szczególnie w kontekście napraw DNA związanych z usuwaniem uszkodzonych zasad azotowych. Zarazem rezultaty te prowokują do zadawania dalszych pytań i planowania kolejnych eksperymentów, które niewątpliwie będą prowadzone w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*.

Wątpliwości, jakie nasunęły mi się po analizie wyników, to:

- a) czy były prowadzone jakieś próby analizy densytometrycznej rozdziału elektroforetycznego żelu wykorzystanego do analizy Western blot lub też nawet już samych specyficznych sygnałów dla białka LigA i Msmeg_1981 widocznych na Ryc.5.11? Takie podejście pozwoliłoby na bardziej precyzyjne określenie poziomu zahamowania ekspresji białka Msmeg_1981 w badanym szczepie.
- b) Czym można wyjaśnić różnice w mobilności elektroforetycznej kompleksów Msmeg_1981 z jednoniciowym DNA i RNA widocznych na Ryc. 5.12?
- c) Czy Ryc. 5.15 to obraz powstały z nałożenia dwóch kanałów (emisja w świetle czerwonym i zielonym) i dlaczego raz produkty pęknięć substratów są widoczne w postaci fragmentów wyznakowanych heksachlorofluoresceiną, a innym razem cyjaniną 5, skoro poszczególne doświadczenia różnią się od siebie tylko warunkami prowadzenia reakcji, a uracyl występuje zawsze na nici znakowanej Cy5?
- d) W czym przejawia się aktywność peptydazowa białek rodziny SRAP i czy obserwowano lub planuje się poszukiwać takiej aktywności w przypadku białek Msmeg_1891 oraz Rv3226c?

Mam również kilka uwag krytycznych do tego rozdziału. Uważam, że zyskałby on na czytelności, gdyby wyeliminować z niego występujące w kilku miejscach informacje, które zostały wcześniej podane w części metodycznej. Jeszcze bardziej stałby się czytelny, gdyby ryciny złożone z wielu składowych zostały podzielone na mniejsze elementy (np. Ryc. 5.7, czy 5.15), a stosowne legendy znalazły się pod każdym z tych elementów, co powodowałoby, że nie trzeba byłoby szukać opisu trzy strony dalej. Co więcej, zarówno te legendy, jak i oznaczenia stosowane wokół lub na fotografiach powinny być bardziej precyzyjne, aby nie trzeba było się domyślać, co znaczą np. odręczne, ledwo widoczne cyfry 0, -1, -2, ... -5 na Ryc. 5.7 (nota bene w Metodach napisano, że wysiewano rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-5}), czy co oznaczają niebieskie strzałki na Ryc. 5.15, gdyż w legendzie nie ma o nich wzmianki.

11-stronnicowy rozdział *Dyskusja* stanowi podsumowanie uzyskanych wyników i skonfrontowanie ich z dość skromnymi informacjami dotyczącymi podobnych mechanizmów, opisanymi w światowej literaturze przedmiotu. Większość dostępnej wiedzy, na którą powołuje się Doktorant, dotyczy *E. coli* bądź też organizmów eukariotycznych, co świadczy o stawianiu przez niego pionierskich kroków w obszarach mechanizmów naprawczych u *Mycobacterium*. Cennym zwieńczeniem toku rozumowania przedstawionego w tym rozdziale jest niewątpliwie propozycja wstępnego schematu możliwego udziału białka Msmeg_1891 w naprawach DNA zawierającego uracyl. Moim zastrzeżeniem

dotyczącym koncepcji przeprowadzenia dyskusji jest kwestia przedstawienia chronologii opisywanych doświadczeń. W rozdziale *Wyniki, badania screeningowe*, które wskazały MMS jako jedyny czynnik genotoksyczny, indukujący efekt fenotypowy w postaci zahamowania wzrostu mutantów niezdolnych do syntezy białka Msmeg_1891 lub jego homologa Rv3226c, były przedstawione jako punkt wyjścia do bardziej szczegółowych analiz z użyciem rekombinowanego szczepu z obniżoną zdolnością ekspresji Msmeg_1891. Natomiast w *Dyskusji*, z bliżej nie znanych przyczyn, ta chronologia została niepotrzebnie odwrócona. Nie uważam też za w pełni prawidłowo sformułowane zdanie ze str. 122: „*Ze względu na wpływ metylosulfonianu na integralność i stabilność genomu, prawdopodobnie rola badanych w niniejszej rozprawie doktorskiej białek, należących do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP), jest znacząca w naprawach uszkodzeń powodowanych przez ten związek*”. Wydaje mi się, że w takim rozdziale pracy, jakim jest *Dyskusja*, formułowane wnioski powinien mieć bardziej ogólny charakter. W toku ewolucji białka SRAP, w tym Msmeg_1891 czy Rv3226c, wyspecjalizowały się, aby umożliwić skuteczną naprawę określonych uszkodzeń, w związku z tym, pisząc o roli tych białek, należy raczej rozpatrywać ich aktywność w kontekście danego typu uszkodzenia, a nie konkretnego związku, z którym w naturze te drobnoustroje raczej się nie spotykają.

Rozdział *Wnioski i stwierdzenia końcowe* zawiera cztery najważniejsze, czytelnie sformułowane spostrzeżenia wynikające z przeprowadzonych badań. Streszczenia w języku polskim i angielskim przygotowano prawidłowo. Spis cytowanych publikacji zawiera 101 dobrze dobranych, aktualnych pozycji literatury przedmiotu.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na stronę edytorską przedłożonej monografii. To zdecydowanie najłagodniejszy jej aspekt. Obok dość licznych błędów gramatycznych, stylistycznych, literowych, napotkałem także wiele nieścisłości, niestaranności w formułowaniu zdań, skrótów myślowych, które niestety wpływają na warstwę merytoryczną. Wymienię tylko kilka z tych ostatnich, pozostałe przekazując Doktorantowi w postaci uwag naniesionych na recenzowany egzemplarz monografii: str. 20. – „...*plazmidy z tępymi końcami 5'...*” – jak wiadomo tępe końce są powstają w wyniku przecięcia obu nici naprzeciwko siebie, a w cytowanej tu pracy mowa jest o końcach tępych oraz lepkich z wystającym 5' końcem, str. 29. – „...*wiązania się do określonych uszkodzeń DNA – miejsc apurynowych/apirymidynowych (AP/APE)...*” – APE to oznaczenie endonukleazy AP, a nie miejsc apirymidynowych, str. 123. – „...*wektorów pET28a noszących gen msmeg_1891 w fuzji N- i C- końca ze znacznikiem polihistydynowym 6xHis*” – geny nie mają końców N i C i nie mogą nosić znacznika aminokwasowego, tylko sekwencję kodującą taki znacznik. Chciałbym też zwrócić uwagę Doktoranta na nieprawidłowe stosowanie terminu częstotliwość zamiast częstość (str. 16), nagminne nierozróżnianie dywizu od myślnika i bardzo swobodne stosowanie spacji wokół tych znaków interpunkcyjnych, a także na niekonsekwencję w stosowaniu terminologii, czego przykładem mogą być nazwy glikozylaz występujące w trzech różnych, nie zawsze prawidłowych, wariantach, czy nazwy substratów DNA, gdzie niesparowanie U-G jest oznaczane dwukropkiem, natomiast C-A, A-A, G-T już nie. Myślę, że dobrze

byłoby także zwracać na przyszłość większą uwagę na formatowanie tekstu w taki sposób, aby legendy do rycin znajdowały się w miarę możliwości na tej samej stronie co grafika, bo to znacząco ułatwia analizę prezentowanej informacji.

Przedstawione powyżej pytania, wątpliwości i uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę strony naukowej recenzowanej rozprawy. Zaprezentowane wyniki eksperymentalne stanowią oryginalne podejście do zrozumienia roli badanych białek, wnosząc bez wątpienia aspekt nowości naukowej. Wykorzystany wachlarz technik doświadczalnych jest imponujący, a uzyskane rezultaty stanowią wkład w światowy rozwój reprezentowanej przez Doktoranta dyscypliny. Mam nadzieję, że dane te staną się wkrótce podstawą do przygotowania wartościowych publikacji naukowych.

Wniosek końcowy

W moim przekonaniu, rozprawa doktorska mgr. Filipa Gąsiora spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie – Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 20 lipca 2018 r. z późn. zm. Przedstawione badania zostały przeprowadzone na wysokim poziomie naukowym, z wykorzystaniem świetnego warsztatu metodologicznego Doktoranta, stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr. Filipa Gąsiora do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

