

dr hab. Małgorzata Marczak, prof. UMCS
Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. +48 81 537 59 68
fax: +48 81 537 59 59
e-mail: malgorzata.marczak@mail.umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Filipa Gąsiora

pt. "Analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawy DNA – Msmeg_1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju *Mycobacterium*"

Promotor: **dr hab. Anna Brzostek, prof. IBM PAN**, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Promotor pomocniczy: **dr Przemysław Płociński**, Uniwersytet Łódzki

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Filipa Gąsiora została przygotowana w ramach realizacji projektu OPUS 17 nr 2019/33/B/NZ1/02770, pt. „Weryfikacja roli białek – przewidywanych czynników naprawczych, biorących udział w naprawach pęknięć DNA u mykobakterii”, którego kierownikiem jest Promotor pomocniczy rozprawy, dr Przemysław Płociński. Rozprawa doktorska zawiera wyniki oryginalnych badań, których celem była weryfikacja zaangażowania wcześniej zidentyfikowanych białek w procesy naprawy uszkodzeń DNA u prątków oraz charakterystyka tych białek, w tym ich zdolności wiązania DNA i RNA, specyficzności substratowej oraz identyfikacji białek partnerskich.

Rozprawa mgr. Filipa Gąsiora została poprawnie skonstruowana i zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej w formie manuskryptu. Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę badawczą przeglądem literatury, w którym najwięcej uwagi poświęcono mechanizmom naprawy uszkodzeń DNA w *Mycobacterium*, co jest oczywiście słuszne z punktu widzenia celu badawczego ocenianej rozprawy. Otrzymujemy w nim obecny stan wiedzy dotyczący rozpoznania mechanizmów naprawy DNA u prątków. Rozdział jest syntetyczny, co uważam za słuszne podejście, gdyż można z powodzeniem wprowadzić czytelnika w temat badawczy nie rozbudowując „Wstępu” do 50-60 stron. Autorowi rozprawy należy się pochwała za autorskie rysunki podsumowujące opisywane mechanizmy naprawy DNA w *Mycobacterium*. Jednak, skoro są to modele prezentujące mechanizmy rozpoznane w określonej grupie bakterii (jak wynika z podpisów do rycin), można było na rysunkach uwzględnić nazwy enzymów specyficznych dla tych bakterii (ewentualnie uzupełniając nazwami homologów *E. coli*). W zaprezentowanej formie schematy wyglądają dość bezpostaciowo. Wstęp dostarcza bardzo ogólnej charakterystyki rodzaju *Mycobacterium* i klasyfikacji prątków patogennych dla człowieka. Czytelnikowi nie będącemu specjalistą w zakresie biologii tej grupy bakterii podrozdział ten musi pozostawiać zdecydowany niedosyt, a to w końcu charakterystyka modelu badawczego. Zabrakło również wyraźnego nakreślenia motywacji podjęcia tematyki badawczej, uwzględniającego badania Promotora pomocniczego, dr Przemysława Płocińskiego. Doktorant ograniczył się do zaledwie kilku zdań na ten temat na początku rozdziału „Wyniki” - uważam, że ta część zasługiwała na opis bardziej szczegółowy.

Cel pracy został jasno sprecyzowany - zaplanowano określenie funkcji dwóch homologicznych białek *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, posiadających cechy białek z rodziny SRAP (ang. SOS response associated peptidases) i weryfikację ich udziału w naprawie uszkodzeń DNA. Realizację celu zaplanowano na drodze określenia, czy pochodne szczepów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* pozbawione odpowiednich białek będą wykazywać zmienioną wrażliwość na działanie czynników genotoksycznych powodujących różne uszkodzenia DNA. Zaplanowano również przygotowanie oczyszczonego rekombinowanego białka Msmeg_1891 celem pozyskania specyficznej surowicy anty-Msmeg_1891 oraz do określenia zdolności wiązania tego białka z

jedno- i dwuniciowymi substratami DNA i RNA, zarówno prawidłowymi, jak i zawierającymi specyficzne uszkodzenia. Biorąc pod uwagę rolę biologiczną białek systemów naprawczych, zaplanowano również poszukiwanie białek oddziałujących z Msemg_1891, analizę ekspresji genu *msemg_1891* po zadziałaniu metanosulfonianu metylu oraz globalną analizę transkryptomyczną mutantu *M. tuberculosis* pozbawionego białka Rv3226c w odpowiedzi na ekspozycję na metanosulfonian metylu.

Cel pracy realizowano z wykorzystaniem bogatego warsztatu badawczego obejmującego: namnażanie *E. coli* oraz *Mycobacterium* i badanie przeżywalności odpowiednich mutantów *Mycobacterium* po ekspozycji na działanie czynników genotoksycznych, szereg technik pracy z DNA (od izolacji DNA, przez klonowanie molekularne do sekwencjonowania), transformację *E. coli* i *Mycobacterium*, konstrukcję mutantów (różne podejścia metodyczne), izolację RNA, przygotowanie bibliotek do RNA-Seq oraz qRT-PCR, nadprodukcję białek rekombinowanych, ich oczyszczanie za pomocą różnych technik chromatograficznych i techniką western blot, oraz badanie interakcji białko - DNA/RNA (różnymi metodami). To naprawdę imponujący, różnorodny warsztat badawczy, który świadczy o wszechstronności Doktoranta.

Jeśli chodzi o opis stosowanych metod, został on słusznie podzielony na metody pracy z DNA, RNA, białkami oraz sposoby namnażania bakterii i prowadzenia analiz fenotypowych. Opis jest w zasadzie wystarczająco szczegółowy, aby móc powtórzyć większość eksperymentów, aczkolwiek Autor nie ustrzegł się pewnych niedociągnięć. Niektóre plazmidy, których konstrukcja jest opisywana w tej części nie znalazły się w odpowiedniej tabeli w opisie materiałów. Nie wiadomo, czy plazmid pJAM-FLAG-TEV-*msemg_1891* wprowadzano do szczepu dzikiego *M. smegmatis* czy do mutantu pozbawionego odpowiedniego genu; niezrozumiałą jest również cel izolacji DNA genomowego z *M. smegmatis* po wprowadzeniu plazmidu pJAM-FLAG-TEV-*msemg_1891* (str. 70), transformacji nim *E. coli*, by następnie wyizolować plazmidowy DNA i poddać go analizie restrykcyjnej i sekwencyjnej - czy na pewno o taką sekwencję czynności chodziło? Zastrzeżenia budzi opis „oczyszczania kompleksów białkowych” (str. 71), który w obecnej postaci nie pozwoliłby na powtórzenie eksperymentu. W przypadku hybrydyzacji Southern (4.2.17) wymieniono inny zestaw do znakowania i detekcji niż w materiałach. Zabrakło też konsekwencji w kwestii podawania lub nie pełnych nazw związków chemicznych, zaś cytowana w tej części literatura nie znalazła się w końcowym spisie.

Opis części eksperymentalnej Doktorant rozpoczyna od konstrukcji mutantów z delecją *msemg_1891* (*M. smegmatis*) i *rv3226c* (*M. tuberculosis*) oraz weryfikacji genotypu otrzymanych mutantów. W opisie metod (str. 66-67) pojawia się informacja, że przeprowadzono „(...) klonowanie do wektora p2NIL fragmentów DNA flankujących gen docelowy na końcu 5' i 3' (gen z wewnętrzną delecją) (...)”, w spisie plazmidów do manipulacji genetycznych w Tabeli 3.4, że klonowano fragmenty „poniżej 3' końca” oraz „powyżej 5' końca” odpowiednich genów, zaś z rycin 5.1. - 5.5 wynika, że konstruowane mutanty miały zawierać delecje wewnętrzne genów. W mojej opinii te informacje nie są spójne - jedne sugerują, że usuwane były całe geny, inne, że tylko wewnętrzne fragmenty. Proszę o komentarz, jak było w istocie? Jeśli były to wewnętrzne delecje, a ich długość, jak wynika z rycin 5.1. - 5.5., nie jest równa wielokrotności 3 (zatem nie są to delecje in-frame), to czy możliwe jest, że w komórkach mutantów DCO mogło być produkowane krótkie białko, z sekwencją aminokwasową zmienioną od miejsca delecji? Czy określenie „*M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji *msemg_1891*” jest określeniem prawidłowym - takie obniżenie można zaindukować w hodowli w odpowiednich warunkach, ale czy jest ono trwałe?

Wyselekcjonowane i zweryfikowane mutanty DCO poddano testom na przeżywalność po zadziałaniu wybranych czynników genotoksycznych, powodujących różne uszkodzenia DNA. Wykazano tym samym, że spadek przeżywalności jest obserwowany po ekspozycji mutantów w obrębie genów *msemg_1891* i *mpg* na działanie metanosulfonianu metylu. Spadek przeżywalności obserwujemy również w przypadku mutantu delecyjnego *M. tuberculosis* w homologicznym genie *rv3226c*. **Dlaczego w testach nie wykorzystano komplementowanego mutantu $\Delta rv3226c$, choć opis jego konstrukcji zamieszczono w rozdziale 4.2.14?** W przypadku szczepu z indukowanym anhydrotetracykliną zahamowaniem ekspresji genu *msemg_1891* nie doszukałam się informacji, jak zaprojektowano eksperyment, tj. na którym etapie dodawano induktor względem momentu ekspozycji na MMS. Na tym etapie należało też zasygnalizować, że podobnie jak dla

mutantów delecyjnych, dla tego szczepu również potwierdzono zamierzony efekt jakim w tym przypadku było obniżenie poziomu ekspresji genu *msmeg_1891* (opisano to dopiero nieco dalej w osobnym podrozdziale).

Następnie przystąpiono do przygotowania oczyszczonego rekombinowanego białka Msemg_1891 w fuzji z etykietką histydynową. Na str. 75-76 Autor opisuje konstrukcję plazmidów ekspresyjnych warunkujących produkcję wariantów białka ze znacznikiem na różnych końcach. Zabrakło komentarza, dlaczego optymalizację nadprodukcji prowadzono dla szczepów *E. coli* niosących tylko jeden z nich (informacja, dlaczego wykorzystano tylko konstrukt kodujący białko Msemg_1891 z etykietką Hisx6 na C-końcu pojawia się dopiero w dyskusji). **Jakie przesłanki zadecydowały o użyciu szczepu *E. coli* Rosetta?** Zgodnie z opisem, białko rekombinowane oczyszczano najpierw za pomocą chromatografii metalopowinowactwa, a następnie oczyszczano dodatkowo na kolumnie jonowymiennej i przez filtrację żelową. Uzyskano w ten sposób czysty preparat białka rekombinowanego Msemeg_1891. **W tekście na str. 95 znajdujemy odniesienie do Ryc. 5.9., na której moim zdaniem pokazano rozdział frakcji po chromatografii metalopowinowactwa, a nie po oczyszczaniu dodatkowym, jak wynikałoby z treści (również pojawiające się w opisie Ryc. 5.9. sformułowanie „oczyszczanie z wykorzystaniem komórek” jest dużym skrótem myślowym).**

Surowicę uzyskaną z wykorzystaniem oczyszczonego białka Msemeg_1891 jako antygeny testowano na białkach lizatów komórek *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*, potwierdzając jej swoistość oraz brak białka Msemg_1891 w komórkach odpowiedniego mutantu delecyjnego. Wykazano również, że zgodnie z zamierzeniem, w szczepie *M. smegmatis*-pLJR962- \downarrow *msemg_1891* dochodzi do wyraźnego obniżenia poziomu ekspresji genu *msmeg_1891*. Specyficzność oddziaływania przeciwciał z białkiem w lizatach *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* jest porównywalna, choć białka te różnią się wyraźnie masą cząsteczkową. **Jaki jest poziom identyczności/podobieństwa białek Msemg_1891 i Rv3226c na poziomie sekwencji aminokwasowej?**

Istotnym etapem charakterystyki funkcjonalnej białka Msemg_1891 były testy wiązania z różnymi substratami DNA i RNA. Potwierdzono zdolność wiązania białka z substratami jednoniciowymi DNA i RNA, a następnie określano specyficzność substratową Msemg_1891 z zastosowaniem substratów dsDNA zawierających syntetycznie wbudowane rybonukleotydy i 2'-deoksyurydynę. **Czym podyktowany był wybór substratu o takiej a nie innej sekwencji nukleotydów? Dlaczego substraty dsDNA (Ryc. 5.13) mają inną sekwencję nukleotydów niż używane substraty jednoniciowe?** Rycina 5.14. prezentuje wyniki potwierdzające oddziaływanie białka z badanymi substratami. Jeśli kompleksy białko-DNA oznaczono na dolnym zdjęciu niebieskimi strzałkami, to **co reprezentują analogiczne prążki na zdjęciu górnym?** Jeśli czerwona strzałka wskazuje na produkt pęknięcia nici znakowanej cyjaniną dla substratu z 2'-deoksyurydyną, to **co reprezentują analogiczne, szybciej migrujące fragmenty na tym samym zdjęciu?**

Optymalizacja warunków reakcji białka Msemg1891 z dsDNA zawierającym dU wykazała, że białko to działa najefektywniej w obecności jonów Co^{2+} w temp. 36°C i w określonym wcześniej stosunku stężeń „białko : substrat DNA”. Potwierdzono również aktywność Msemg_1891 względem dsDNA zawierającego dU błędnie sparowaną z guaniną (dU:G). **Z czego wynika różnica w wydajności reakcji „dU + Msemg_1891” między zdjęciami A, B i C Ryc. 5.15.? Dlaczego uznano, że temp 36°C jest najlepsza?** Stosując termoforezę mikroskalarną wykazano, że wzrost ilości dU w ssDNA powoduje wzrost siły wiązania Msemg_1891 z substratem. **Doktorant nie skomentował jednak w żadnej części pracy, czym jest współczynnik Kd oraz jak został wyznaczony?**

W mojej ocenie bardzo ważnym etapem badań ocenianej rozprawy było poszukiwanie białek partnerskich dla Msemg_1891. W zaproponowanym modelu badawczym wykorzystano szczep *M. smegmatis* z plazmidem umożliwiającym indukowaną acetamidem nadprodukcję białka Msemg_1891 z odpowiednią etykietą i ustalono, że z białkiem Msemg_1891 współocyszczają się białka związane z systemami naprawy DNA mykobakterii. **Zabrakło jednak jakiegokolwiek formy wizualizacji wyników identyfikacji współocyszczających się białek.** Jednocześnie Doktorant wspomina, że badania są kontynuowane oraz o trudnościach technicznych związanych z oczyszczaniem potencjalnych białek partnerskich, co oznacza, że

podjęto tu jakieś próby. Z czego wynikają owe trudności? Czy możliwe byłoby zaprojektowanie eksperymentu, w którym wykorzystano by fakt, że gen *msmeg_1891* ulega ekspresji na wyraźnie wyższym poziomie po ekspozycji na MMS? Czy w takich warunkach prawdopodobnie nie ulega zwiększeniu również poziom ekspresji genów kodujących białka potencjalnie współdziałających z *Msmeg_1891* w naprawie? Proszę o komentarz.

Za pomocą qRT-PCR wykazano, że ekspresja genu *msmeg_1891* *M. smegmatis* ulega wyraźnej indukcji po zadziałaniu MMS, co widoczne jest również na poziomie białka (sprawdzono techniką western blot). Z czego może wynikać różnica dla 60. i 90. min na Ryc. 5.20 vs Ryc. 5.21?

Eksperyment zamykający rozprawę to globalna analiza zmian w transkryptomie mutantu *M. tuberculosis* Δ rv3226c po zadziałaniu czynnikiem MMS. Ustalono, że istotne zmiany w poziomie transkrypcji dotyczą większej liczby genów dla szczepu dzikiego nietraktowanego vs. traktowanego MMS oraz mutantu nietraktowanego vs. traktowanego MMS (odpowiednio 940 i 882 genów), niż w przypadku układów: szczep dziki vs. mutant (nietraktowane MMS) oraz szczep dziki vs. mutant (traktowane MMS) (odpowiednio 84 i 86 genów). Wizualizacja takich wyników za pomocą Volcano plot jest oczywiście ważna, bo pokazuje zakres, kierunek i istotność obserwowanych zmian w ekspresji genów. Dla układu, w którym badane białko nie ma charakteru regulatorowego, dla mutantu oczekiwałabym raczej zmian w ekspresji genów o charakterze wtórnym względem mutacji, a będących pochodną stresu genotoksycznego, którego komórka nie może zniwelować. W tabelach 5.1. i 5.2. zaprezentowano profil ekspresji wybranych genów mutantu, których ekspresja jest istotnie i wyraźnie różna względem szczepu dzikiego w warunkach normalnych (Tabela 5.1) i w warunkach stresu genotoksycznego (Tabela 5.2). Czym kierowano się wybierając geny do tabeli? Dlaczego przy opisie funkcji genu *rv3226c* (który w zasadzie pełni tu funkcję kontroli, gdyż gen, którego nie ma nie ulega ekspresji) widnieje określenie „nieznana”? Czy funkcje przypisane genom to wynik jedynie automatycznej adnotacji będącej częścią analiz bioinformatycznych? Jeśli tak, to jakich baz używano i czy można było pokusić się o inne analizy umożliwiające przewidywanie funkcji przynajmniej części z tych „nieznanych genów”?

Podsumowując, sposób przedstawienia wyników oceniam pozytywnie. Doktorant wykazał się umiejętnością ich analizy i interpretacji na tle literatury przedmiotu. Dyskusja jest dobrze poprowadzona, zaś wnioski końcowe w pełni uzasadnione. Pomijając kwestie językowe oraz niepotrzebne powtórzenia metodyczne, lektura tych części stanowi dobrą klamrę dla całej rozprawy. W jej trakcie zrodziło się tylko jedno pytanie o białka SRAP: skąd tak naprawdę w nazwie tych białek określenie „peptydaza”, skoro pełnią one w istocie funkcję glikozylaz?

Kończąc, pozwalam sobie na komentarz odnośnie poprawności redakcyjnej rozprawy, która choć nie podlega ocenie, nie jest doskonała. W numerację rozdziałów wkradł się błąd. Szereg cytowań pojawiających się w manuskrypcie nie znalazło się w spisie literatury, natomiast znalazły się tam pozycje, które nie były cytowane. W samej bibliografii są również pomyłki w kolejności nazwisk autorów lub roku opublikowania artykułów. Lista skrótów i skrótowców jest bardzo przydatna, jednak Doktorant skrupulatnie, choć niepotrzebnie, powtarza objaśnienia w całej pracy. Opis wyników i dyskusja zawierają zbyt wiele powtórzeń metodycznych. Odnotowałam również kilka niepoprawnych lub nielogicznych sformułowań oraz żargonu, np.: „sekwencja DNA” (powinno być „sekwencja nukleotydów w cząsteczce DNA”); „uracyl może być wbudowany w sekwencję DNA podczas replikacji” (str. 16); nieprawidłowe tłumaczenie nazwy składnika wzbogacającego OADC (str. 11); „tępe końce 5' ” (str. 20); „chromatyda siostrzana” w odniesieniu do kopii chromosomu bakterii po replikacji (str. 22); „W wyniku błędów replikacji DNA, polimerazy wprowadzać mogą w jego sekwencję nukleotydy, które będą błędnie sparowane z niewłaściwymi zasadami” (str. 25); kontrowersyjne zaliczenie wirusów i bakteriofagów do organizmów (str. 28); „konstrukcja plazmidu z obniżonym poziomem ekspresji genu (...)” (str. 69); „(...) surowica (...) została wykorzystana do potwierdzenia detekcji z badanym białkiem (...)” (str. 97); „wycięcie” w odniesieniu do nukleotydów lub miejsc AP; oraz „miejsca przecinania” w odniesieniu do endonukleaz restrykcyjnych (str. 43).

Ocena końcowa

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wykazano w niej udział białek Msmeg_1891 i Rv3226c w naprawie uszkodzeń DNA spowodowanych działaniem metanosulfonianu metylu, zdolność wiązania się Msmeg_1891 do jedno- i dwuniciowych substratów DNA/RNA, w tym zawierających syntetycznie wprowadzone rybonukleotydy lub 2'-deoksyurydyne oraz wykazano jego aktywność enzymatyczną podobną do glikozylaz uracyl-DNA. Zidentyfikowano również białka partnerskie dla Msmeg_1891, które są adnotowane jako potencjalne uczestniczące w naprawach uszkodzeń DNA u *Mycobacterium*. Uzyskane wyniki wskazują na funkcję białek Msmeg_1891/Rv3226c w procesach naprawy z usuwaniem uszkodzonych zasad azotowych (BER). **Rozprawa prezentuje ponadto ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętność prowadzenia pracy naukowej przez mgr. Filipa Gąsiora. Uwagi krytyczne zawarte w recenzji, dotyczące głównie warstwy językowej i edytorskiej pracy, nie wpływają na pozytywną ocenę całości dysertacji przedłożonej mi do recenzji.**

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska "Analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawy DNA – Msmeg 1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju *Mycobacterium*" spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, oraz wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN o dopuszczenie mgr. Filipa Gąsiora do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Małgorzata Marczak

