



UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Łódź, 11.07.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
Kierownik Zakładu i Katedry  
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### **Recenzja pracy doktorskiej**

mgr Eweliny Lechowicz

Enzymy zaangażowane w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Promotor: prof. dr. hab. Jarosław Dziadek

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Eweliny Lechowicz pt.: „Enzymy zaangażowane w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii”, została wykonana pod opieką naukową promotora prof. dr. hab. Jarosława Dziadka, a została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Rozprawa doktorska została przedstawiona do recenzji, zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Układ rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac o charakterze doświadczalnym. Dysertacja jest klasycznym opracowaniem liczącym 134 strony. Konstrukcję pracy doktorskiej oparto na 10 głównych rozdziałach zawierających wstęp, cel pracy, szczegółowo opisane materiały i metody oraz zastosowane procedury, wyniki badań, ich dyskusję, wnioski, wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w j. polskim i angielskim, spisu rycin i tabel, piśmiennictwa. Poszczególne rozdziały pracy są logiczne, prawidłowo ułożone i stanowią kompleksową całość. Dobór piśmiennictwa jest prawidłowy i obejmuje najważniejsze pozycje literaturowe z zakresu prowadzonych badań. W pracy zacytowano 70 publikacji naukowych. Proporcje poszczególnych części pracy są adekwatne do charakteru pracy, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano prawidłowo. Od strony formalnej praca nie budzi zastrzeżeń. Tytuł pracy koresponduje z wyznaczonym celem i treścią rozprawy. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w zakres planowanych badań, nakreślając w zarysie genezę powstania pracy. Przegląd literatury oparty o aktualne i ważne publikacje stanowi niezwykle istotny wkład w pracę oraz potwierdza właściwość zaplanowanych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Eweliny Lechowicz była identyfikacja oraz charakterystyka enzymów uczestniczących w procesie dojrzewania 3' końca cząsteczek tRNA u mykobakterii. We wstępie Doktorantka obszernie przedstawia charakterystykę RNA i jego funkcje. Cel pracy zostały sformułowany jasno i precyzyjnie, jest bardzo aktualny i ma duże wartości praktyczne. Każda funkcjonalna cząsteczka tRNA zdolna do aminoacylacji odpowiednim aminokwasem musi zawierać terminalną sekwencję CCA. Analizy baz danych wskazują, że u mykobakterii spośród 45 zidentyfikowanych rodzajów tRNA tylko 23 geny kodują tRNA wraz z terminalną sekwencją CCA. Wydaje się, że proteom mykobakterii musi posiadać enzym o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA (TNT), znany również jako enzym dodający sekwencję CCA, analiza anotowanych genów u mykobakterii nie pozwoliła jednak na identyfikację genu kodującego enzym TNT. Mgr Ewelina Lechowicz temat pracy zrealizowała poprzez następujące cele cząstkowe:

1. Konstrukcję mutantów *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* z obniżonym poziomem białka Rv3907c oraz Rv2783c z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9.
2. Globalną analizę transkryptomiczną mutantów CRISPR/Cas9 z obniżonym poziomem ekspresji genów rv3907c oraz rv2783c.
3. Konstrukcję mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnej kopii genów kodujących odpowiednio: RNazę PH, RNazę T, RNazę D, RNazę Z1 i RNazę Z2 oraz mutantów wielokrotnych (pozbawionych dwóch, trzech i czterech egzonukleaz rodziny DnaQ).
4. Konstrukcję mutantów *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem ekspresji RNaz PH i T przy użyciu systemu CRISPR Cas9.
5. Globalną analizę transkryptomów wybranych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych egzonukleaz nadrodziny DnaQ.
6. Zbadanie aktywności enzymatycznej egzonukleaz DnaQ wobec wybranych substratów RNA i DNA.

Część doświadczalna pracy obejmuje przedstawione przez Doktorantkę materiały i metody wykorzystane podczas badań. W rozdziale „Materiały i metody” Autorka wykazała wykorzystane szczepy bakterii, aparaturę, zastosowane metody badawcze oraz przebieg badań. W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawia identyfikację enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA w proteomie mykobakterii metodami *in silico*, identyfikację roli białka CCA<sub>Mtb</sub> w komórkach mykobakterii, Globalna analiza transkryptomiczna mykobakterii z obniżonym poziomem ekspresji genu CCA<sub>Mtb</sub>, opisuje poszukiwanie enzymów o aktywności egzonukleolitycznej/endonukleolitycznej zaangażowanych w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii, ocenę aktywności badanych enzymów *M. smegmatis* z nadrodziny DnaQ oraz analizę transkryptomiczną mutantów nukleaz z nadrodziny DnaQ.

Pierwszy etap eksperymentów zaplanowanych w pracy obejmował identyfikację enzymu o aktywności nukleotydyloytransferazy tRNA w proteomie mykobakterii. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wskazywała, że enzymem o takiej aktywności powinien być produkt genu rv3907c. Aby zweryfikować eksperymentalnie postawioną hipotezę skonstruowano rekombinowane szczepy *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* charakteryzujące się obniżonym poziomem enzymów CCA<sub>Mtb</sub> oraz CCA<sub>Msm</sub>. Analiza RNA Seq wykazała akumulację 18 rodzajów tRNA, z 45 wszystkich rodzajów identyfikowanych u *M. tuberculosis*. Niedojrzałe cząsteczki tRNA, które nagromadziły się po obniżeniu poziomu ekspresji CCA<sub>Mtb</sub>, były silnie poliadenylowane. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, enzymem, który obok polimerazy poli(A), może być odpowiedzialny za

proces poliadenylacji w komórkach bakteryjnych jest PNPaza (nukleotydylotransferaza polirybonukleotydoma) kodowana przez *gps1*. W recenzowanej pracy, w celu zbadania czy za zjawisko poliadenylacji transkryptów przy niedoborach enzymu CCAMtb u mykobakterii odpowiada PNPaza, opracowano szczep o obniżonej ekspresji genów *ccaMtbCas9* oraz *gps1MtbCas9*. Metodą sekwencjonowania (RNAseq) potwierdzono, że zjawisko poliadenylacji transkryptów koreluje pozytywnie z obniżonym poziomem enzymu CCAMtb w obecności niezaburzonej ekspresji genu *gps1* co udokumentowało, że za poliadenylację przy niedoborach CCAMtb odpowiada enzym PNPaza.

Kolejnym etapem pracy było poznanie funkcji egzonukleaz zaangażowanych w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii. W tym celu skonstruowano szereg pojedynczych i wielokrotnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących *rnPH*, *rnT*, *rnZ1*, *rnZ2*, *rnD*, oraz oczyszczono rekombinowane białka w systemie heterologicznym *E. coli*. Ocena aktywności badanych enzymów *M. smegmatis* pozwoliła na wnioskowanie, że u mykobakterii funkcjonalną egzonukleazą uczestniczącą w procesie dojrzewania 3' końca tRNA jest RNaza T. Analiza transkryptomyczna wykazała, że w przypadku niedoborów RNaz PH i T dochodzi do nadprodukcji wielu rodzajów tRNA w komórkach prątków gruźlicy, dodatkowo analiza transkryptów wykazała, że są one niekompletne i zawierają wyłącznie fragment 5' cięty w regionie pętli antykodonu. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że *Rv3907c* pełni u mykobakterii kluczową funkcję nukleotydylotransferazy tRNA, dlatego co niezwykle interesujące może być rozpatrywany jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych tuberkulostatyków.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące i szeroko opisane. Świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu wywodu, który umożliwił osiągnięcie postawionego w pracy celu. W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka opisała przedstawione w pracy wyniki analiz w konfrontacji z danymi literaturowymi krajowymi i zagranicznymi. W pracy wykorzystano literaturę z dobrych, recenzowanych anglojęzycznych czasopism, traktującą często temat na podstawie badań wielośrodkowych prowadzonych na przestrzeni kilku lat. Wskazuje to na dobre rozeznanie tematu przez Autorkę i potwierdza umiejętność korzystania z baz danych, co jest niezwykle ważne dla badacza.

W ocenie merytorycznej realizacji zmierzonych celów pracy należy podkreślić wyśmienicie zaplanowany oraz przemyślny proces badawczy, który pozwolił na kompleksowe obserwacje, które w znacznym stopniu mogą się przysłużyć do projektowania i praktycznego zastosowania

nowych tuberkulostatyków. Jednocześnie należy pokreślić, iż przeprowadzone badania są wynikiem bezpośredniej współpracy Doktorantki z promotorem pracy Panem prof. dr. hab. Jarosławem Dziadkiem i odzwierciedlają wyśmienity poziom naukowy kierowanej przez Pana Profesora jednostki naukowej Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium, Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, tym bardziej że temat pracy jest interesujący, ale bardzo wymagający. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć autorskie i nowatorskie wyniki, w wyniku których realizacja pracy doprowadziła do następujących wniosków końcowych:

1. Rv3907c jest enzymem o aktywności nukleotydolotransferazy tRNA zaangażowanym w niezbędny proces syntezy terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA u mykobakterii.
2. Zahamowanie możliwości syntezy terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA u mykobakterii prowadzi do ich poliadenylacji zależnej od obecności PNPazy.
3. Główną, lecz nie niezbędną egzonukleazą uczestniczącą w procesie dojrzewania 3' końca-tRNA u prątków jest RNaza T.

W podsumowaniu należy jednoznacznie stwierdzić, że cel pracy obejmuje jednej z najważniejszych kierunków badań w dziedzinie biologii infekcyjnej, jakim jest poszukiwanie nowych skutecznych leków przeciwbakteryjnych. Zjawisko oporności na antybiotyki wielu groźnych szczepów i gatunków bakterii jest obecnie bardzo poważnym problemem współczesnej mikrobiologii klinicznej. Dlatego, lekooporność patogennych bakterii jest olbrzymim wyzwaniem dla współczesnych badań, których celem jest identyfikacja nowych molekularnych celów ukierunkowanej terapii zakażeń. Prątki gruźlicy stanowią szczególnie wyzwanie ze względu na rozpowszechnianie szczepów ekstremalnie opornych na niemal wszystkie dostępne tuberkulostatyki. Dodatkowo, zjawisko to jest naturalnie potęgowane poprzez zdolność tych bakterii do unikania systemu odpornościowego gospodarza oraz na możliwość ich przetrwania w tkaniach w stanie uśpienia metabolicznego. **W odniesieniu do otrzymanych wyników, chciałbym zapytać Doktorantkę o możliwości praktycznego wykorzystania zrealizowanych w pracy celów, w kierunku projektowania nowych skutecznych tuberkulostatyków. Jakie dodatkowe badania należy wykonać, aby potwierdzić ten niezwykle obiecujący kierunek rozwoju celowanych leków dla terapii zakażeń bakteryjnych?**

Recenzowana rozprawa Pani mgr Eweliny Lechowicz ma niewątpliwie wysoki walor aplikacyjny wynikający z aktualności poruszanych zagadnień dla mikrobiologii klinicznej i niewątpliwie jest przykładem doskonałego modelu współpracy Promotora oraz Doktorantki, która

korzystając z wieloletniego oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu. Opiniowana rozprawa doktorska zasługuje na uznanie, gdyż świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, a jasno określone cele badawcze pozwoliły na uzyskanie istotnych i wiarygodnych wyników.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, dlatego mam zaszczyt i przyjemność przedstawić Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wnioszek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Lechowicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ze względu wysoki poziom naukowy, w tym nowatorskie metody badawcze uwzględniające zastosowanie transkryptomiki, które znalazły zastosowanie aplikacyjne pozwalające na efektywne projektowanie nowych skutecznych tuberkulostatyków, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Lechowicz wykonanej pod kierunkiem promotora Pana Prof. Jarosława Dziadka.

Z poważaniem,

KIEROWNIK  
Katedry Chemii i Biochemii Medycznej  
Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterski