

prof. dr hab. Katarzyna Potrykus
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 28.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Eweliny Lechowicz
„Enzymy zaangażowane w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii”

Zgodnie z dogmatem biologii molekularnej, informacja zawarta w materiale genetycznym danego organizmu (w postaci DNA lub RNA) zostaje przepisana na sekwencję białkową na podstawie cząstek RNA. W proces ten, zwany translacją, zaangażowane są trzy różne rodzaje RNA – mRNA (niosący zakodowaną informację), rRNA (wchodzący w skład rybosomów, czyli dużych kompleksów molekularnych, w których dochodzi do syntezy białek) oraz tRNA (cząstek, które dostarczają do rybosomów aminokwasy niezbędne do syntezy danego białka). Cząsteczki tRNA pełnią więc kluczową rolę w odkodowywaniu informacji genetycznej, a enzymy biorące udział w ich dojrzewaniu są niezbędne do ich właściwego funkcjonowania. Chodzi tutaj o enzymy biorące udział w modyfikowaniu reszt nukleotydowych (np. enzymy przekształcające urydynę w pseudourydynę lub dihydrourydynę, czy metylujące adenozyne lub guanozyne), lecz także o RNazy, które docinają cząsteczki tRNA w odpowiednim miejscu, a także enzymy dołączające odpowiednie nukleotydy (CCA) do tzw. ramienia akceptorowego czyli końca 3' cząsteczki tRNA. Modyfikacje końca 3' cząsteczki tRNA są o tyle istotne, iż tylko do prawidłowo dojrzałego końca może zostać przyłączony odpowiedni aminokwas, w wyniku czego powstanie tzw. naładowany tRNA biorący udział w translacji.

Mimo, że do tej pory dosyć dobrze poznano proces dojrzewania tRNA u modelowych bakterii, np. *Escherichia coli*, dla wielu patogenów człowieka, takich jak prątki gruźlicy, enzymy zaangażowane w edycję końca 3' tRNA nie były do tej pory znane. Problem ten jest istotny, ponieważ wiedza na temat takich enzymów może posłużyć do opracowania nowych strategii w zwalczaniu zakażeń spowodowanych przez te groźne bakterie. Badania nad wspomnianymi enzymami byłyby więc nie tylko zasadne, ale i wysoce pożądane w dobie wzrastającej oporności prątków na dostępne antybiotyki.

Dlatego, na uznanie zasługuje fakt, iż takie badania zostały podjęte przez Panią mgr Ewelinę Lechowicz, która ze cel swojej rozprawy doktorskiej obrała identyfikację i charakterystykę enzymów uczestniczących w dojrzewaniu końca 3' tRNA u mykobakterii. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. Jarosława Dziadka, w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Pani mgr Lechowicz w swoich badaniach wykonała szereg badań wykorzystując techniki *in vitro*, *in vivo* oraz *in silico*, co jest osiągnięciem imponującym. W pierwszej kolejności została przeprowadzona

analiza bioinformatyczna w celu identyfikacji nukleotydylotransferazy tRNA (gen *cca*) u *M. tuberculosis* (Rv3907c) i *M. smegmatis*, a następnie zostały skonstruowane odpowiednie mutanty w tych szczepach i przeprowadzono globalną analizę transkryptomoczną. Następnie Doktorantka postanowiła przyjrzeć się RNazom zaangażowanym w przycinanie końca 3' tRNA. W tym celu skonstruowała mutanty delecyjne w genach kodujących RNazę PH, RNazę T, RNazę D, RNazę Z1 i RNazę Z2 w szczepach *M. smegmatis*. W różnych pożywkach badano wzrost mutantów niosących pojedyncze delecje oraz ich kombinacje. Następnie wykonano globalną analizę transkryptomoczną dla szczepów *M. smegmatis* niosących delecje podwójne (w genach dla RNazy PH i T) lub poczwórne (w genach dla RNazy PH, T, Z1 i D); oraz dla szczepów *M. tuberculosis* niosących pojedyncze delecje w genach dla RNazy PH lub RNazy T. Dodatkowo, sklonowano geny *M. smegmatis* kodujące RNazę PH, RNazę T, RNazę D, RNazę Z1 i RNazę Z2, a następnie dokonano ich nadekspresji w komórkach *E. coli*. Oczyszczone białka wykorzystano do zbadania ich aktywności względem różnych substratów DNA i RNA *in vitro*.

Uważam, że cel jaki postawiła sobie Doktorantka, tj. określenie i scharakteryzowanie enzymów zaangażowanych w dojrzewanie końca 3' tRNA u mykobakterii został osiągnięty, a za najważniejsze osiągnięcia przedstawionej rozprawy doktorskiej uważam:

1. Skonstruowanie szczepów *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* z deplecją białka Cca oraz ich analiza transkryptomoczną.
2. Sklonowanie, nadekspresja, oczyszczenie, a przede wszystkim scharakteryzowanie pod względem biochemicznym RNaz PH, T, D, Z1 i Z2 pochodzących z *M. smegmatis*.
3. Zidentyfikowanie RNazy T jako głównej RNazy biorącej udział w obróbce końca 3' tRNA u mykobakterii.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma klasyczny układ i jest podzielona na odpowiednie rozdziały. Za spisem treści został zamieszczony „Wykaz skrótów” (2 strony). Następnie w rozdziale „Wstęp” (18 stron) zostały opisane zagadnienia związane z różnymi rodzajami RNA występującymi w komórkach bakteryjnych, procesy dojrzewania niekodujących cząstek RNA oraz enzymy zaangażowane w te procesy. Podrozdział 1.1 („Rodzaje RNA w komórce bakteryjnej”), jest niestety bardzo niespójny i podane są raczej wyrywkowe fakty. Podano np. informację na temat okresu półtrwania mRNA u *M. smegmatis* (5 min) i *M. tuberculosis* (9,5 min w logarytmicznej fazie wzrostu), natomiast okres półtrwania mRNA u *E. coli* skwitowano stwierdzeniem, że jest on „stosunkowo krótki” (str. 8). Proszę doktorantkę o doprecyzowanie tego stwierdzenia. W tym samym podrozdziale podano iż „W degradacji RNA uczestniczą także same cząsteczki RNA, które mogą katalizować proces odtwarzania cząsteczek RNA (turnover)” (str. 9). Proszę, aby Doktorantka wyjaśniła ten proces.

Również informacje zawarte w podrozdziale 1.2 wymagają doprecyzowania. Wyjaśnienia wymaga stwierdzenie dotyczące mykobakterijnych sRNA (str. 10) – „Niektóre z nich są w dużej ilości obecne w zainfekowanych liniach komórkowych i u zakażonych pacjentów, sugerując udział sRNA w interakcjach na styku patogen-gospodarz”. Co Doktorantka rozumie pod pojęciem występowania w liniach komórkowych i u pacjentów? Czy te sRNA występują w środowisku poza cytoplazmatycznym lub w płynach ustrojowych? Na str. 13 podano za to informację, iż „w ostatnich latach zidentyfikowano

dużą liczbę cząsteczek sRNA". Proszę o doprecyzowanie chociaż rzędu wielkości tej liczby. Z kolei podrozdział 1.5.1, w którym opisano dojrzewanie rRNA wywołuje pewien niedosyt. Dokładnie został opisany proces dojrzewania 5S i 16S rRNA, natomiast został pominięty proces dojrzewania 23S rRNA.

Kolejny rozdział to „Cel pracy” (1 strona), gdzie w sposób syntetyczny opisano także cele cząstkowe, co ułatwia zrozumienie jakie były kolejne etapy pracy. Korzystając z okazji chciałabym dopytać Doktorantkę czy gen *rv2783c* wspomniany w pierwszym i drugim celu cząstkowym to gen pochodzący z *M. smegmatis* będący odpowiednikiem *rv3907c* z *M. tuberculosis*? W całej pracy gen ten jest wspomniany tylko w tych dwóch miejscach, natomiast w odpowiednich podrozdziałach w Wynikach mowa jest o genie *msmeg_6926*.

Następne rozdziały to „Materiały” (22 strony) oraz „Metody” (16 stron). Ilość i różnorodność opisanych metod oraz liczba skonstruowanych przez Doktorantkę plazmidów (44) są imponujące i pozwalają mniemać, iż Pani mgr Lechowicz do perfekcji opanowała techniki biologii molekularnej. W obu rozdziałach zawarto olbrzymią ilość informacji; być może z tego powodu niektóre istotne kwestie umknęły jednak uwadze Doktorantki. Podano na przykład producentów odczynników i używanych zestawów, pominięto jednak numery katalogowe producenta. W większości przypadków ta informacja może być zbędna, jednakże w niektórych przypadkach jest to bardzo ważna kwestia dla kogoś kto chciałby powtórzyć doświadczenia wykonane przez Doktorantkę. Nie wiadomo np. jaka RNaza była stosowana do usuwania zanieczyszczeń RNA z próbek DNA (str. 39; podano tylko, że została kupiona z Sigma-Aldrich); jakie inhibitory proteaz zawierał koktajl, który stosowano przy oczyszczaniu białek (str. 42; w tym wypadku nie podano nawet producenta); czy też jakich przeciwciał drugorzędowych użyto w technice Western-blot (str. 45). Pominięto także kwestię składu buforów, które posłużyły do doczyszczania białek za pomocą filtracji żelowej (str. 55).

Bardzo zaciekał mnie natomiast schemat przedstawiony na Rycinie 4.25, w zamyśle opisujący metodę poszukiwania mutantów SCO (*single cross-over*) i DCO (*double cross-over*). Nie zawiera on jednak żadnych opisów, prosiłabym zatem Doktorantkę o wyjaśnienie, w jaki sposób powstają mutanty DCO? W pierwszej części pokazano powstawanie mutantów SCO, które identyfikuje się jako białe kolonie na płytkach zawierających X-gal. Następnie zaś do czynienia mamy z seryjnymi rozcieńczeniami i poszukuje się niebieskich kolonii. Czy hodowle należy prowadzić w jakichś zdefiniowanych warunkach? Czy DCO w jakiś sposób sztucznie się indukuje, czy może jest to proces spontaniczny?

Chciałabym zwrócić również uwagę na błąd, który się wkradł w równanie służące do interpretacji wyników qRT-PCR (metoda komparatywna) (str. 63). Podano wzór $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdy oczywistym wydaje się, iż chodzi o $R=2^{\Delta\Delta Ct}$. Można by to uznać, za błąd edytorski, jednakże zastanawia interpretacja R. Podano: „Wartość poniżej 1 oznacza, że poziom ekspresji w szczepie dzikim jest większy niż w szczepie badanym, i na odwrót w przypadku, gdy wartość R jest większa od 1”. Stosując poprawione równanie, interpretacja byłaby odwrotna – wartość poniżej 1 oznacza, że ekspresja w szczepie dzikim jest mniejsza niż w szczepie badanym. Proszę aby doktorantka ustosunkowała się do tej uwagi i wyraźnie wskazała w jaki sposób interpretowała otrzymane wartości R w podrozdziałach dotyczących

uzyskanych wyników, gdyż jest to kluczowe do stwierdzenia, czy analiza i wysnute na jej podstawie wnioski są poprawne.

Najobszerniejszy podrozdział przedstawionej rozprawy stanowią „Wyniki” (46 stron). Doktorantka w sposób w dużej mierze poprawny, aczkolwiek miejscami chaotyczny, podjęła się opisać olbrzymią ilość danych, które otrzymała w wyniku swoich badań. Na początku (podrozdział 5.1) podjęta została analiza bioinformatyczna genomu *M. tuberculosis* w celu identyfikacji nukleotydylotransferazy odpowiedzialnej za dołączanie nukleotydów do końca 3' tRNA, tak aby powstała sekwencja CCA. Na rycinie 5.1 przedstawiono porównanie sekwencji dla trzech domen enzymu – domeny charakterystycznej dla polimeraz β klasy II, domeny wiążącej RNA, oraz domeny HD. W pierwszych dwóch przypadkach, porównania dokonano dla genów pochodzących z *M. tuberculosis*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* oraz *Homo sapiens*. W przypadku domeny HD, zamiast genu pochodzącego z *H. sapiens*, do porównania użyto genu pochodzącego ze *Staphylococcus aureus*. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego porównania nie wykonano dla tych samych organizmów w przypadku wszystkich domen.

W kolejnym podrozdziale (5.2) opisano konstrukcję szczepów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* z deplecją genu *cca*. Uważam jednak, że tytuł tego podrozdziału („Identyfikacja roli białka CCA_{Mtb} w komórkach mykobakterii”) jest niewłaściwy, gdyż nie przedstawiono tutaj żadnych danych, które tą rolę mogłyby wskazać. W pierwszym paragrafie podano jedynie, że „przygotowane szczepy (...) zostały wykorzystane do analiz wzrostu w warunkach laboratoryjnych, przeżywalności w obecności czynników mutagennych, a także dokonano globalnej oceny ich transkryptomu”. Globalna ocena transkryptomu jest opisana w kolejnym podrozdziale (5.3), natomiast nigdzie nie pokazano danych dotyczących wzrostu czy przeżywalności w obecności mutagenów. Na stronie 69 podano za to, iż „Efekt zahamowania wzrostu zaobserwowano także dla szczepu *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem CCA_{Mtb} rosnącym na podłożu, bogatym, mineralnym, w niskim pH a także w warunkach hipoksji” (podkreślenie jest moje). Dodano także informację, iż wyniki te wchodzą w skład pracy doktorskiej dr E. Błaszczyk. Rodzi się zatem pytanie, czy Doktorantka wykonała doświadczenia związane ze wzrostem mutantów deplecyjnych i ich wrażliwość na substancje mutagenne, lecz przy natłoku otrzymanych wyników i ich opisywaniu dane te zostały niechcący pominięte (gdyby je zamieszczono, to wtedy tytuł podrozdziału byłby uzasadniony), czy może doświadczenia te w ogóle nie zostały wykonane?

Jak już wspomniałam, w kolejnym podrozdziale (5.3) dokonano analizy transkryptomu szczepów z deplecją genu *cca*. Na stronie 71 zamieszczono informację, iż wykryto 20 zmian poziomu ekspresji genów pomiędzy szczepem dzikim, a szczepem z deplecją; 6 z pośród nich dotyczą zmienionego poziomu tRNA. Bardzo mnie ciekawi, których genów dotyczyły pozostałe zmiany? Czy Doktorantka może zaproponować jaką rolę w ekspresji tych genów odgrywałby enzym Cca?

W kolejnym podrozdziale Pani mgr Lechowicz dokładnie opisuje konstrukcję mutantów *M. smegmatis* niosących delecje w genach dla RNaz z rodziny DnaQ (zwanej również DEDD), a mianowicie w genach kodujących RNazę PH, D, T, Z1 i Z2. Szczepy te zostały wykorzystane do zbadania wpływu braku jednej lub więcej RNaz na wzrost komórek *M. smegmatis* w pożywkach bogatych (7H9/OADC) i ubogich (pożywka minimalna z glicerolem lub cholesterolem jako jedyne źródła

węglu). Poczyniono tutaj ciekawe obserwacje, że najbardziej upośledzony wzrost wykazywały pojedyncze lub wielokrotne mutanty z delecją genu dla RNazy T.

W kolejnym etapie pracy, Doktorantka podjęła się sklonowania, nadekspresji i oczyszczenia wspomnianych RNaz. Otrzymane białka posłużyły następnie do zbadania ich aktywności względem przykładowych fragmentów DNA i RNA. Z rozczarowaniem muszę jednak stwierdzić, że nigdzie w pracy nie podano jaki był skład mieszanin reakcyjnych, w których badano tą aktywność. Zarówno w „Metodach” jak i w podrozdziale 5.5 (str. 93) podano jedynie, że „Optymalne warunki reakcji takie jak: stężenie białka, skład buforu, temperaturę i czas inkubacji wyznaczano indywidualnie dla każdego enzymu”. Stwierdzenie to niestety nie jest wystarczające do tego by móc powtórzyć przedstawione doświadczenia. Być może Doktorantka chciała uniknąć nadmiernych opisów, jednakże dane te można było zamieścić w jednej tabeli. Chciałabym również zapytać Doktorantkę o zastosowane przez nią substraty DNA i RNA - czy Doktorantka sama je zaprojektowała? Dodatkowo - na jakiej podstawie wybierano substraty dla każdej z RNaz (z przedstawionych danych wynika, że nie wszystkie substraty stosowano dla każdej z nich)?

W następnym (ostatnim) etapie pracy, Pani mgr Ewelina Lechowicz dokonała analizy transkryptomicznej szczepów *M. smegmatis* niosących delecję w genach dla RNaz PH i T, oraz poczwórnego mutantu z delecją genów kodujących RNazę PH, T, Z1 oraz D (podrozdział 5.6). Podobne prace wykonała dla szczepów *M. tuberculosis* niosących delecję w genie dla RNazy PH lub T. Przedstawiona analiza globalnych transkryptomów jest z pewnością poprawna, wydaje się jednak nieco powierzchowna i budzi spory niedosyt. Znacznie bardziej szczegółowo przedstawiono analizę transkryptomu dla bibliotek małych RNA, uzyskanych na podstawie całkowitego RNA wyizolowanego ze wspomnianych szczepów *M. tuberculosis*.

W tabelach zamieszczonych na Ryc. 5.6.1 i Ryc. 5.6.2 podano np. ile genów ulega zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji w każdym mutancie względem szczepu dzikiego oraz względem siebie, nie podano jednak zestawienia, które są to geny. Bardzo interesujące byłoby także porównanie krzywych wzrostu badanych mutantów w warunkach w jakich pobierano próbki do analizy transkryptomicznej. Niestety, nie podano takich danych, a do tego w żadnym miejscu rozprawy nie podano informacji na temat tego jakie były warunki hodowli mykobakterii (pożywka, temperatura, faza wzrostu), z których wyizolowano RNA do analiz transkryptomicznych przedstawionych w podrozdziale 5.6 czy nawet 5.3. Proszę Doktorantkę o podanie tych warunków.


W rozdziale „Dyskusja” (6 stron), Pani mgr Lechowicz dojrzałe i wystarczająco obszernie omówiła najważniejsze uzyskane przez siebie wyniki na tle dostępnych danych literaturowych. Rozdział ten jest bardzo uporządkowany i spójny. Kolejne rozdziały to „Wnioski” (1 strona), streszczenia w języku polskim i angielskim (każde na 2 strony), oraz spis literatury obejmujący 70 pozycji bibliograficznych. Wszystkie z wymienionych podrozdziałów zostały przygotowane poprawnie.

Na koniec, z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o pewnych niezgrabnościach stylistycznych czy innych drobnych niedociągnięciach jakie pojawiły się w pracy. Doktorantka nagminnie

używa żargonowych lub niepoprawnych określeń jak: bakterie „gramoujemne” (zamiast: Gram ujemne); enzymy lub reszty „konserwatywne” (zamiast: konserwowane ewolucyjnie); „zliniowanie plazmidu” (zamiast: zlinearyzowanie); często pojawia się stwierdzenie, iż w badaniach fizycznie używano „sekwencje” oligonukleotydowe (zamiast: „fragmenty” oligonukleotydowe); w opisie żeli (np. Ryc. 5.4.1, 5.4.2) zastosowano sformułowanie „linia” zamiast „ścieżka”. Ponadto, niepoprawnie podano skład buforu TAE (str. 41), a na Ryc. 5.3.1, 5.3.3, 5.3.5 zastosowano oznaczenia PAP lub PAPI względem stosowanych mutantów. Jest to bardzo mylące, ponieważ w tekście opisywane były wyniki dla mutantów w genie *cca*, a nie genie polimerazy poli(A) (PAP I). Dopiero w rozdziale „Dyskusja” podano, iż w bazach danych gen *cca* był mylnie zidentyfikowany jako gen kodujący PAP I i można się domyślić, że być może stąd wynika taki podpis na rycinach.

Można jednak uznać, iż te drobne uchybienia nie mają znaczącego wpływu na ogólnie pozytywny odbiór całej pracy i nie obniżają jej sporej wartości merytorycznej. Chciałabym jeszcze raz podkreślić, że Doktorantka wykonała ogrom pracy, a ilość oraz zakres przeprowadzonych przez nią doświadczeń są imponujące. Moje pytania i komentarze w dużej mierze dotyczą prezentacji przedstawionych wyników lub wynikają z ciekawości recenzenta.

W podsumowaniu, uważam, iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład w rozwój wiedzy nt. procesów zachodzących u mykobakterii, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu związanego z edycją i dojrzewaniem końca 3' tRNA u tych organizmów i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Zaprezentowana została ogólna wiedza teoretyczna Pani mgr Lechowicz w zakresie dyscypliny nauki biologiczne, a sama rozprawa potwierdza Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Lechowicz spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim (zgodnie z warunkami określonymi w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce). Jednocześnie wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Lechowicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

 Uniwersytet Gdański
Katedra Genetyki Molekularnej Bakteri
K. Potrykus
prof. dr hab. Katarzyna Potrykus