

Wrocław 10.08.2023

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Lechowicz pod tytułem „Enzymy zaangażowane w dojrzewanie 3’ końca tRNA u mykobakterii”

Recenzowana praca została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytutu Biologii Medycznej, PAN w Łodzi pod opieką prof. dr hab. Jarosława Dziadka. Doktorantka skupiła się na ciekawym, mało poznanym zagadnieniu modyfikacji cząsteczek tRNA. Należy wziąć pod uwagę, że małe cząsteczki RNA zaangażowane są w istotne mechanizmy regulatorowe o ogromnym znaczeniu dla biologii bakterii. Regulacja przez małe RNA pomaga bakteriom w adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych. Wciąż jednak niewiele wiadomo o enzymach zaangażowanych w modyfikacje RNA u prątków. Tematyka badań jest zatem ciekawa i nowatorska, a badania tej grupy bakterii mogą przyczynić się do zrozumienia ich zdolności przetrwania niekorzystnych warunków, także takich jakie napotykają podczas infekcji.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki należy uznać:

- pokazanie wpływu obniżenia poziomu Rv3907c (zwanego białkiem CCA) na pulę cząsteczek RNA oraz na zwiększoną poliadenylację tRNA u *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*,
- określenie aktywności *in vitro* wybranych enzymów z grupy RNaz oraz efektów biologicznych ich eliminacji u *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*,



- określenie roli kluczowej RNazy T w dojrzewaniu 3' końca cząsteczek tRNA,

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Wstęp zawiera staranny opis funkcji niekodujących cząsteczek RNA oraz ich modyfikacji, w tym enzymów zaangażowanych w proces dojrzewania RNA ze szczególnym uwzględnieniem różnych typów egzonukleaz. Docenić należy szczegółowe zestawienie dostępnych informacji na temat bakteryjnych RNaz. Wstęp wzbogacony jest o tabelę przedstawiającą różnorodność funkcji różnych cząsteczek sRNA. Dodatkowymi elementami poprawiającymi czytelność Wstępu mogłyby być dalsze pomocnicze tabele i rysunki. Na przykład przedstawione na stronie 10 mechanizmy działania małych RNA lub opisany szczegółowo na stronie 14 proces dojrzewania RNA mogłyby być zilustrowane odpowiednimi rysunkami. Z kolei kompendium wiedzy o RNazach mogłoby zostać zawarte w tabeli, co ułatwiłoby usystematyzowanie przedstawionej wiedzy. Ponadto, w moim odczuciu wyodrębnienie we Wstępie informacji dotyczących prątków pomogłoby we wprowadzeniu czytelnika do dalszych części pracy.

Cel pracy jest syntetycznie ujęty, wyodrębniono też cele cząstkowe. Rozdział Materiały zawiera poprawne zestawienia wykorzystywanych w pracy pożywek, oligonukleotydów oraz plazmidów, w oparciu o które przygotowano pochodne wektorów wykorzystane do konstrukcji szczepów *Mycobacterium*. Uważam jednak, że przydatne byłoby gdyby zestawienia szczepów (Tab 3.1.1) zawierały również szczepy *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* używane i skonstruowane w ramach pracy, a nie jedynie szczepy wyjściowe. Materiały i aparaturę wykorzystaną w pracy wymieniono w postaci listy. Warto podkreślić fakt, że lista przygotowanych w ramach pracy konstruktów jest bardzo obszerna, co obrazuje ogromny nakład pracy Doktorantki.

Rozdział Metody przedstawia szeroki zakres stosowanych podejść eksperymentalnych. Obejmowały one typowe metody biologii molekularnej, konstrukcje zmodyfikowanych szczepów bakteryjnych metodą CRISPR- Cas i ich weryfikacje, oraz analizy RNA w tym sekwencjonowania oraz analizy z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern blot. Metody są opisane poprawnie. Z obowiązku recenzenta wspomnę jednak niewielkich niedociągnięciach, których można się dopatrzeć w rozdziale Metody. Nie znalazłam informacji o warunkach testów aktywności nukleolitycznej badanych RNaz. Wątpliwości budzi też sposób przedstawienia sposobu klonowania na rys. 4.18, na którym nie zaznaczono, po której stronie genu znajduje się sekwencja kodująca His-tag. Rys. 4.35 jest łatwiejszy do zrozumienia, ale też

mógłby być dopracowany, pomocne byłoby też zaznaczenie promotora w pEL28/30 na tym rysunku.

Wyniki uzyskane w ramach pracy opisano w 6 podrozdziałach. Przedstawiono kompleksowe analizy z zastosowaniem różnych podejść badawczych. Pracę rozpoczęto od identyfikacji białka CCA za pomocą analiz bioinformatycznych, następnie analizowano zmiany poziomu i sekwencji małych RNA w zmodyfikowanych szczepach *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych białka CCA. Cenne jest tutaj uzupełnienie typowych analiz transkryptomicznych badaniami małych RNA. Następnie poszukując enzymów odpowiedzialnych za procesowanie tRNA przeprowadzono analizy biochemiczne potencjalnych RNaz. W tym celu wyizolowano szereg zrekombinowanych białek i oceniono ich aktywność nukleolityczną. Wymagało to niezależnych optymalizacji warunków indukcji i oczyszczania 6 białek. Analizy aktywności RNaz z rodziny DnaQ przeprowadzono z wykorzystaniem serii starannie zaprojektowanych substratów – matryc oligonukleotydowych. Badania *in vitro* uzupełniono poprzez badania zmodyfikowanych szczepów pozbawionych genów kodujących białka z rodziny DnaQ. Niezwykle starannie udokumentowano opis weryfikacji zmodyfikowanych szczepów. Następnie przeprowadzono analizy kinetyki ich wzrostu, a także analizy transkryptomiczne oraz bardzo przydatne analizy sekwencji małych RNA dla szczepów z obniżonym poziomem RNazy PH i RNazy T. Uzyskane wyniki są ciekawe, nowatorskie i wnoszą bardzo wiele do zrozumienia biologii RNA. Szczególną wartość ma połączenie badań genetycznych i transkryptomicznych oraz badań biochemicznych. Pewne zastrzeżenia mogą dotyczyć jedynie niektórych fragmentów opisu wyników. Jednym z mankamentów przedstawienia wyników jest brak jasności, które ze wspomnianych wyników to wyniki wstępne, czy uzupełniające, a które zostały uzyskane w ramach pracy. Dotyczy to wzmianki o aktywności *in vitro* białka Rv3907, opisu szczepu z delecją *cca* i *gps1*, czy wzmianki o wzroście szczepu *M. tuberculosis* z deplecją RNazy PH lub T, które są wspomniane ale nie pokazane. Podobnie nie pokazane zostało wspomniane na s. 69 zahamowanie wzrostu szczepu z deplecją CCA. Jeśli wyniki te nie stanowią części pracy, to stosowne byłoby umieszczenie wzmianki o tym w Wstępie lub Celu pracy, ułatwiło by to znacznie zrozumienia strategii badawczej, alternatywnie można by rozważyć ich pokazanie w postaci suplementu. Dalsze uwagi i sugestie, które miałyby na celu poprawienie klarowności pracy to zwiększenie dyscypliny i konsekwencji we wprowadzaniu i stosowaniu nazw badanych białek i genów (dotyczy to np. białka CCA) oraz dopracowanie czytelności rysunków (np. rys. 5.3.1. opis po angielsku, rys. 5.3.3, niejasny opis ścieżek, rys. 5.3.5 i 5.3.6, 5.5.6-5.5.13

– zastrzeżenia co do czytelności opisów, schematów substratów, podobnie 5.6.1, 5.6.2 i 5.6.8, zwłaszcza niejasny jest panel C – ze względu brak konsekwencji w nazwach szczepów). Ponadto rysunek 5.3.3 trudno odnieść do wcześniejszego rys 5.3.2 – nie wiadomo dlaczego do weryfikacji wybrane zostały te właśnie cząsteczki tRNA. W przypadku analizy RNA-seq na rys 5.6.1, 5.6.2 – nie podano wartości granicznych zmiany (log FC), natomiast w tabeli 5.6.3, i 5.6.6. i 5.6.7 – podano różnice - wartości liczbowe, ale nie opisano dokładnie, co oznaczają wspomniane liczby. W kilku miejscach wskazany też byłby bardziej dokładny opis niektórych wyników na przykład na s. 94 dokładniej można by opisać stosowane substraty.

Dyskusja jest dojrzała i ciekawa a jednocześnie zwięzła. Doktorantka podsumowuje obserwowane zmiany modyfikacji tRNA w badanych szczepach w oparciu o wykrytą aktywność nukleolityczną analizowanych enzymów. Doktorantka umiejętnie interpretuje swoje wyniki w odniesieniu do danych literaturowych. W Dyskusji nie zabrakło propozycji wyjaśnienia obserwowanych zjawisk oraz zaproponowania mechanizmów działania badanych RNaz. Praca zakończona jest krótkimi, syntetycznymi wnioskami. Rozprawa została przygotowana w oparciu o około 70 pozycji literaturowych. Są to przede wszystkim prace z ostatnich 10 lat. Dodatkowo praca zawiera wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Warto też dodać, że praca przygotowana jest starannie pod względem edytorskim (pomijając wspomniane opisy rysunków w rozdziale Wyniki), nie dostrzegłam istotnych błędów w odsyłaczach ani zwrotów żargonowych.

Pytania, które nasunęły się podczas czytania pracy i o których przedyskutowanie w czasie publicznej obrony chciałbym poprosić Doktorantkę to: jak można wytłumaczyć brak bezpośredniej zależności pomiędzy cząsteczkami tRNA zmienionymi przy deplecji białka CCA a obecnością CCA w ich sekwencji (co przedstawioną na rys. 5.3.1) oraz jakie może być wytłumaczenie globalnych zmian transkryptomicznych na skutek eliminacji wybranych RNaz, jakie mogą być mechanizmy takich zmian? Zaciekała mnie także hipoteza zaproponowana w Dyskusji (s.113), wskazująca, że poliadenylacja RNA niekoniecznie musi prowadzić do ich degradacji lecz raczej akumulacji. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować doświadczenie weryfikujące tę hipotezę. Proszę również o wyjaśnienie przesłanek na podstawie, których dobrano zestaw substratów dla analiz RNaz *in vitro*.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Eweliny Lechowicz w znaczący sposób poszerza wiedzę na temat procesu dojrzewania cząsteczek tRNA u prątków. Jak wspomniano, niezwykle cennym aspektem pracy jest umiejętne połączenie badań aktywności RNaz *in vitro* z analizami i funkcji biologicznej

poprzez analizy fenotypowe i transkrypcyjne zmodyfikowanych szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*. Uważam, że rozprawa mgr Eweliny Lechowicz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i jasno wskazuje, że Doktorantka nabyła wiedzę teoretyczną w tematyce rozprawy oraz umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Lechowicz spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w artykułe 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 Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Eweliny Lechowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

D. Jankowska

