

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Palasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 02.10.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Katarzyny Struś
„Analiza funkcjonalna dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału
MSMEG6236/MSEME6238 u *Mycolicibacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*)”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Struś została wykonana pod opieką naukową promotora Pana prof. dr hab. Jarosława Dziadka oraz Pani dr hab. Anny Żaczek jako promotora pomocniczego, zaś miejscem wykonywania pracy było Laboratorium Molekularnych Analiz Bakterii i Grzybów Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Na początku chciałam podkreślić, że bardzo cenię prace doktorskie powstałe w zespole profesora Dziadka – zawsze są one cennym wkładem w naukę, a poziom przedstawianych badań jest niezmiennie wysoki. Niniejsza praca nie odbiega w żadnej mierze od tego standardu. Rozprawa Pani mgr Struś jest poświęcona analizom działania bardzo istotnych dla bakterii systemów przenoszenia sygnału. Bakterie, jako organizmy jednokomórkowe, muszą reagować na zmiany środowiska w sposób szybki i efektywny, tak aby maksymalnie zwiększyć swoje szanse na przetrwanie. Między innymi do tego celu – szybkiej reakcji – służą dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału. Wiedza o ich ogólnym mechanizmie działania – białka pełniącego funkcje kinazy oraz białka regulatorowego – jest znana, jednakże znaczenie dla ekspresji genów i docelowo zmian w metabolizmie bakterii spowodowanych działaniem tych systemów jest bardzo różnorodne. Dlatego systemy te stanowią interesujący

model badawczy, pozwalający na poznanie nie tylko mechanizmów działania samych systemów, ale przede wszystkim ich znaczenia biologicznego dla komórki bakteryjnej. Szczególnie interesujące są te badania w świetle wybranego modelu – prątków *Mycolicibacterium smegmatis*. Bakteria ta jest szybkorosnącym przedstawicielem prątków i jako taka, służy jako model dla badań nad znacznie trudniejszą w hodowli *Mycobacterium tuberculosis*. Prątek gruźlicy jest nadal patogenem o dużym znaczeniu epidemiologicznym, szczególnie przy rozpowszechnieniu szczepów wielolekoopornych, zatem prace nad poznaniem mechanizmów przystosowania mykobakterii do środowiska są niezmiernie ważne zarówno dla badań podstawowych jak i nauk medycznych. Dlatego podjęcie tematyki działania systemów transdukcji sygnału u prątków przez Doktorantkę uważam za uzasadnione i na czasie. Przy okazji, **chciałam zapytać, jak zmiana w taksonomicznej klasyfikacji prątków *Mycobacterium smegmatis* na *Mycolicibacterium smegmatis* wpływa na znaczenie tego modelu badawczego dla prątka gruźlicy, i jakie były podstawy tej zmiany.**

Rozprawa doktorska Pani Mgr Struś ma postać klasycznej monografii, zawierającej 183 strony, napisanej w języku polskim (poza streszczeniem, znajdującym się nietypowo na końcu pracy, napisanym zarówno po polsku jak i angielsku). Praca jest podzielona na odpowiednie sekcje, typowe dla opracowań opartych na badaniach doświadczalnych. Bardzo dokładny spis treści ułatwia nawigację w rozprawie. 32-stronicowy Wstęp poprzedzony jest wykazem skrótów stosowanych w pracy. W tym rozdziale Doktorantka krótko wprowadza w tematykę biologii i znaczenia prątków, a znacznie więcej uwagi poświęca sposobom regulacji ekspresji genów u tych bakterii (co jest słusznym zabiegiem odpowiadającym tematyce pracy). Jednakże, przy opisie czynników sigma, Doktorantka ograniczyła się do opisanie tych występujących u *M. tuberculosis*, gdy stosowniej byłoby opisać te z zastosowanego modelu *M. smegmatis*. We wstępie zostały opisane metabolizm węgla i azotu u prątków – chciałam tu zapytać, **czy prątki mają typowo w swoim środowisku trudności z dostępem do źródła azotu i czy konieczne było powstanie u nich skomplikowanych mechanizmów pozyskiwania tego pierwiastka?** Większa część wstępu poświęcona jest dwukomponentowym systemom transdukcji sygnału. W tym szczegółowym i wnoszącym dużo informacji opisie zabrakło wyszczególnienia, które z opisywanych systemów są obecne u obydwóch gatunków prątków, *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Po dokładnie sprecyzowanym celu pracy Doktorantka zamieściła dwa bardzo ważne i kompetentnie przedstawione rozdziały, Materiały i Metody. Oba te rozdziały są napisane dokładnie, z dbałością o szczegóły (np. zamieszczony spis odczynników wraz z danymi producentów czy aparatury stosowanej w pracy), co umożliwia nie tylko wykorzystanie ich do powtórzenia doświadczeń w innym laboratorium ale także pomaga w zrozumieniu

przedstawianych w kolejnym rozdziale eksperymentów. Szczególną uwagę Doktorantka zwróciła na dokładne przedstawienie skonstruowanych wektorów i szczepów, co podkreśla porządne przygotowanie podstaw genetycznych pracy. Szeroki zakres zastosowanych metod zarówno genetycznych, mikrobiologicznych, jak i wysokoprzepustowych w zakresie transkryptomiki świadczy, że Doktorantka bardzo dobrze porusza się w świecie współczesnej biologii molekularnej. Najdłuższy, 83-stronicowy rozdział rozprawy to Wyniki. W pierwszej części tego rozdziału Pani mgr Struś przedstawiła dane pochodzące z prac nad systemem transdukcji sygnału MnoSR (MSMEG_6238 i MSMEG_6236), w drugiej zaś nad regulatorem MtrB pochodzącym z innego systemu. Rozdział ten jest podzielony na szereg niewielkich podrozdziałów, które ułatwiają podążanie za tokiem myśli Doktorantki, a także pokazują, iż kolejne podejmowane przez Doktorantkę podejścia eksperymentalne były uzasadnione. Przedstawiane wyniki są poparte licznymi dobrze zaprezentowanymi rycinami oraz tabelami i schematami, widać tu dbałość o szczegóły i o dobre zrozumienie przez czytelnika. W rozdziale Dyskusja Pani mgr Struś prezentuje wyniki swojej pracy na tle dotychczasowej wiedzy, a także przedstawia interpretację znaczenia uzyskanych danych. Dyskusja poparta jest licznymi cytowaniami współczesnych prac z dziedziny, szczególnie zwraca uwagę odniesienie do pracy dotyczącej systemu MnoSR, która ukazała się już w czasie realizacji doktoratu i która wpłynęła na kolejne podejścia doświadczalne. Świadczy to o właściwym umiejscowieniu pracy w głównym nurcie naukowym dotyczącym systemów transdukcji sygnału. Wnioski wynikające z dyskusji zostały zaprezentowane w punktach, co jest dobrą praktyką. Rozprawę kończą streszczenia i spis literatury. Ponadto, do pracy została załączona płyta CD zawierająca poza samą rozprawą także wzmiankowany w pracy suplement z danymi transkryptomycznymi. Praca napisana jest bardzo ładnym i jasnym językiem naukowym, z dbałością o prawidłowe wyrażenia i sformułowania. Czyta się ją przyjemnie i bez problemów. Błędy literowe są bardzo nieliczne, co jest rzadkością przy opracowaniach tej długości. Chciałam zwrócić uwagę jedynie na niepoprawne sformułowanie „bakterie gramododatnie” na str. 9 – z zasady powinno być to „bakterie Gram-dodatnie”.

Głównym celem rozprawy było poznanie roli dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MnoSR oraz jednego ze składników innego systemu, białka regulatorowego MtrA. Chciałabym tutaj zapytać, **jaka była podstawa wyboru tych konkretnie systemów, jako że MnoSR nie ma odpowiednika u *M. tuberculosis*, a MtrA został opisany u obydwóch przedstawicieli prątków.** Ponadto, **poprosiłabym o sformułowanie hipotez badawczych stawianych w pracy.** W części eksperymentalnej pracy Doktorantka skonstruowała, stosując dobrze opracowaną w zespole Promotora metodę

homologicznej rekombinacji z wykorzystaniem plazmidów samobójczych, szczepy *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych genów *msmeg_6236* i *6238* oraz podwójnego mutantu w tych genach. Szczepy te zostały zweryfikowane pod względem genotypu oraz poziomu ekspresji odpowiednich genów, co pozwoliło na późniejsze zastosowanie tych bakterii w dalszych badaniach w tej części pracy. Doktorantka początkowo sprawdziła zdolność wzrostu szczepów niosących mutacje w porównaniu ze szczepem typu dzikiego, dodatkowo zastosowano szczepy z komplementacją niefunkcjonalnych genów. Zastosowano różne źródła węgla w pożywce, stwierdzając że w przypadku typowych węglowodanów tempo wzrostu wszystkich szczepów było porównywalne, jednakże zaobserwowane zostało upośledzenie wzrostu mutantów w pożywkach zawierających jako źródło węgla alkohole (np. metanol i etanol). Nasuwa się tu pytanie, **czy *M. smegmatis* w swoim naturalnym środowisku napotyka alkohole jako źródło węgla i czy wyspecjalizowanie się systemu transdukcji sygnału w tym kierunku jest ewolucyjnie uzasadnione.** Co ciekawe, brak funkcjonalnych genów systemu MnoSR nie wpływał na wrażliwość szczepów na wybrane antybiotyki. Dla szerszego poznania roli tego systemu u *M. smegmatis* została przeprowadzona analiza transkryptomyczna porównująca globalną odpowiedź szczepów dzikich i niosących mutacje. Do doświadczeń wybrano warunki niedoboru źródła węgla (w postaci obniżenia stężenia glukozy bądź zastosowania alkoholu 1,3-propandiolu). Pani Katarzyna Struś bardzo umiejętnie przeanalizowała i przedstawiła uzyskane dane, od analizy głównych składowych przez zestaw genów o zmniejszonej i zwiększonej ekspresji do szczegółowego zestawienia procesów metabolicznych regulowanych przez grupy genów o zmienionym poziomie. Badania „omiczne” charakteryzują się olbrzymią ilością uzyskiwanych danych, gdzie najważniejsza jest odpowiednia analiza i interpretacja pod kątem procesów biologicznych. Autorka dołożyła starań, aby przedstawić w swojej rozprawie odpowiednie procesy, na które mogą wpływać zaobserwowane zmiany w poziomie transkryptów danych genów. Wyniki są zilustrowane schematami metabolicznymi z zaznaczeniem genów o zmienionej ekspresji i szczegółowych reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy kodowane przez te geny. Jest to bardzo cenne opracowanie, pozwalające na zrozumienie wpływu zmian w transkryptomie na metabolizm *M. smegmatis*. Wśród procesów, w których system MnoSR może odgrywać ważną rolę, Doktorantka zidentyfikowała metabolizm pirogronianu, związku będącego w centrum wielu procesów metabolicznych i energetycznych oraz metabolizm fruktozy i cykl pentozowy. Są to bardzo ciekawe ustalenia wskazujące na zaangażowanie systemu transdukcji sygnału MnoSR w centralny metabolizm węgla i energii.

W drugiej części pracy Doktorantka podjęła się analizy regulatora MtrA, białka z innego systemu transdukcji sygnału u mykobakterii. Na podstawie podobieństwa w miejscu wiązania do DNA tego białka i regulatora GlnR odpowiedzialnego za proces pobierania azotu, podjęła się zbadania roli MtrA w metabolizmie azotu przez *M. smegmatis*. Wykazano, że oczyszczone białko MtrA wiązało się z rejonem promotorowym genu *amtB*, odpowiedzialnym za transport amonu do komórki. Doktorantka skonstruowała mutanty z niefunkcyjnym genem *mtrA* oraz *glnR* i zastosowała te szczepy do badań zdolności wzrostu w pożywkach zawierających różne źródła azotu. Wyniki, jakie uzyskała, wskazują, iż MtrA bierze udział w uzyskiwaniu azotu z wykorzystaniem niektórych aminokwasów takich jak histydyna, prolina czy metionina. Przeprowadzona została analiza transkryptomu bakterii (mutantów i szczepu dzikiego) w warunkach głodzenia azotowego. Bardzo dokładna analiza (analogicznie przeprowadzona i opisana do tej z pierwszej części rozprawy) wykazała zaangażowanie MtrA w szlaki związane z metabolizmem puryn (a więc pośrednio z syntezą kwasów nukleinowych) oraz niektórych aminokwasów jak arginina, tyrozyna, alanina i glutaminian. Wyniki te wskazują na znaczącą rolę regulatora MtrA w procesach komórkowych. **Chciałam tu zapytać, czy analogiczny system i regulator był identyfikowany u innych bakterii, np. Enterobacteriaceae?**

W przypadku obydwóch analiz wysokoprzepustowych uzyskane dane pochodzą z bakterii rosnących w warunkach niedoboru (węgla dla MnoSR i azotu dla regulatora MtrA). Stan limitowania substancji odżywczych prowadzi do globalnej odpowiedzi komórek, znanej jako odpowiedź ścisła, z jej alarmonem, guanozyno-czterofosforanem (ppGpp) zidentyfikowanym w 1969 roku. Akumulacja ppGpp prowadzi do przeprogramowania ekspresji genów w kierunku zwiększenia szans komórki na przeżycie, a samo działanie alarmonu może być bezpośrednie przez wpływ na maszynę transkrypcyjną jak i pośrednie przez inne regulatory. W związku z zastosowaniem w układzie doświadczalnym głodzenia i limitowania źródeł węgla i azotu, w pracy zabrakło odniesienia do możliwej indukcji odpowiedzi ścisłej w warunkach stosowanych dla analiz transkryptomicznych (jedynie sprawdzono ekspresję genu *relA*), ani nie odniesiono się do poziomu np. stabilnych RNA (zahamowanie transkrypcji których jest pierwszym efektem odpowiedzi ścisłej). Taka analiza przyniosłaby niewątpliwie nowe informacje o globalnych systemach regulatorowych zaangażowanych w odpowiedź na warunki stresowe, szczególnie w świetle niedawno opublikowanej pracy (Baruzzo et al., 2023) o roli sigE w regulacji odpowiedzi ścisłej u *M. tuberculosis*. W związku z tym **poprosiłabym Doktorantkę o komentarz i hipotezy dotyczące działania ppGpp w zastosowanych układach doświadczalnych oraz możliwym**

wplywie odpowiedzi ścisłej na funkcjonowanie dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału.

Rozprawa jest poprowadzona logicznie, wyniki prac eksperymentalnych wskazują na ich staranne zaplanowanie i przeprowadzenie, a wnioski przedstawiane przez Doktorantkę są oparte o jej szeroką wiedzę o tematyce badań. Oceniam osiągnięcia przedstawione w pracy za bardzo cenne dla wiedzy o mykobakteriach i systemach transdukcji sygnału, które pełnią ważną rolę w adaptacji bakterii do środowiska. Chciałam jeszcze zapytać, **jakie może być wykorzystanie otrzymanych wyników dla perspektywicznego opracowania leków przeciwprątkowych?**

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr Struś stanowi cenne uzupełnienie wiedzy o regulacji ekspresji genów i komórkowego metabolizmu u *M. smegmatis* przy udziale systemu transdukcji sygnału MnoS/MnoR oraz białka regulatorowego MtrA. Te oryginalne i wartościowe badania ważne są dla lepszego poznania odpowiedzi prątków na wyzwania środowiskowe i jako takie stanowią także ważny wkład w wiedzę na temat *M. tuberculosis*. Należy wyrazić nadzieję, iż wyniki tych kompleksowo przeprowadzonych badań zostaną wkrótce opublikowane w czasopiśmie naukowym o szerokim zasięgu.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w nawiązaniu do art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669 z późn. zm.). Zwracam się w związku z tym do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Struś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Szalewska - Pęton