

Łódź, 23.08.2023 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski
Katedra Biologii Bakterii
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Katarzyny Struś**

pt. „Analiza funkcjonalna dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału

MSMEG6236/MSMEG6238 u *Mycobacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*)”

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Struś została wykonana w Laboratorium Molekularnych Analiz Bakterii i Grzybów Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Pracą kierowali Promotor - Prof. dr hab. Jarosław Dziadek oraz Promotor pomocniczy - dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR.

Praca doktorska została przygotowana przez mgr K. Struś według reguł przyjętych dla opracowania rozpraw o charakterze eksperymentalnym. Zawiera następujące rozdziały: Wstęp, Cel badawczy, Materiały, Metody, Wyniki, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografię. Zamieszczono też Wykaz skrótów, a także 4 Suplementy na CD z danymi szczegółowymi analizy sekwencji RNA oraz analizą ścieżek metabolicznych, w warunkach głodzenia węglowego i azotowego prątków.

Temat pracy jest powiązany z zainteresowaniami Promotora i jego zespołu badawczego. Zespół ten legitymuje się znaczącymi osiągnięciami w badaniach w zakresie genetyki, fizjologii i patogenności prątków. Bakterie te zawsze wzbudzały zainteresowanie, a nawet grozę u ludzi ze względu na ich chorobotwórczość, a badania ich cech patogenności oraz poszukiwanie skutecznych sposobów terapii zakażeń przez nie wywoływanych, stanowi jeden z głównych obszarów prac naukowych i dociekań lekarzy, mikrobiologów czy immunologów. Prątek gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* i inne prątki są obiektami badań wielu zespołów na całym świecie, dzisiaj ukierunkowanych przede wszystkim na wyjaśnianie mechanizmów regulujących wzrost i przeżywalność tych bakterii oraz oporność na leki. Biorąc pod uwagę ciągły problem skuteczności terapii infekcji wywoływanych tymi

patogenami, niezmiernie ważnym zagadnieniem pozostają poszukiwania nowych tarcz, czy inaczej nazywając, celów molekularnych dla nowych leków. Jedną z możliwości ingerencji w procesy leżące u podstaw wzrostu bakterii, w tym prątków, jest blokowanie systemów transdukcji sygnałów, systemów wykorzystywanych przez nie jako czynników adaptacyjnych, do zmieniających się warunków środowiska, w którym żyją. Wewnątrzkomórkowe patogeny *M. tuberculosis*, jak i szczepy saprofityczne *Mycobacterium smegmatis* charakteryzują się zdolnościami adaptacji do zmian zachodzących w środowisku wzrostu, do których zaliczamy dostępność substancji odżywczych (przede wszystkim źródeł węgla i azotu), obecności antybiotyków i innych środków anty-drobnoustrojowych, metali ciężkich, czy też działania mechanizmów układu odpornościowego gospodarza. A systemy adaptacyjne warunkujące dostosowanie się do niekorzystnych warunków życia tych drobnoustrojów, to m.in. dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału. Są one zaangażowane w wiele procesów charakterystycznych dla komórek bakteryjnych, w tym w transport substancji odżywczych, regulację szlaków katabolicznych, warunkują też wirulencję. Poznanie więc mechanizmów działania tych systemów może być ważnym krokiem w poszukiwaniu blokerów hamujących ich funkcje, a tym samym wzrost prątków. Praca doktorska mgr K. Struś wpisuje się w ten nurt badawczy. Podjęty temat należy uznać za ważny i choć ja w tych badaniach widzę przede wszystkim aspekt poznawczy, trzeba nadmienić, iż wyniki rozprawy w przyszłości mogą być wykorzystane w praktyce, w poszukiwaniu aktywnych biologicznie związków chemicznych interferujących z badanym przez Doktorantkę dwukomponentowym systemem transdukcji sygnału u prątków.

Podstawy teoretyczne rozprawy Doktorantka omówiła w pierwszym rozdziale - Wstępie. Scharakteryzowała bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, w tym obiekt badań prątki szybko rosnące *Mycobacterium smegmatis*. Przedstawiła dane dotyczące zachorowalności na gruźlicę, świadczące o dalej aktualnym, poważnym problemie światowym, w zwalczaniu tej choroby. Wymieniła leki współcześnie stosowane w terapii gruźlicy. Szczególną uwagę zwróciła na mechanizmy umożliwiające prątkom adaptację do zmieniających się warunków środowiska w którym żyją, w tym przede wszystkim się na procesy oparte o regulację ekspresji genów. Ważnym dla wzrostu i możliwości przeżycia bakterii jest dostępność i możliwość wykorzystania źródeł węgla i azotu. Dotyczy to także prątków. Doktorantka omówiła źródła tych pierwiastków dla prątków oraz procesy zaangażowane w ich wykorzystanie. Opisując metabolizm węgla i azotu u tych drobnoustrojów, zwróciła uwagę na „plastyczność” w wykorzystaniu przez nie różnych źródeł tych pierwiastków oraz szlaków ich

utylicacji. Biorąc pod uwagę temat pracy, zrozumiałym jest szerokie potraktowanie we Wstępie przez Doktorantkę dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału u prątków, w kontekście ich adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych ich życia. Omówiła znaczenie kinazy histydynowej w systemie transdukcji, ale najwięcej uwagi poświęciła przeglądowi dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału u *Mycobacterium*. Nie tylko je wymieniła (Ryc. 2), ale także dalej w pracy je szczegółowo omówiła. Wstęp zakończyła przedstawieniem dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MnoSR u *M. smegmatis* oraz dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MtrA-MtrB u tych bakterii.

Przegląd informacji zaprezentowanych w części teoretycznej pracy doktorskiej mgr K. Struś oraz ich analiza świadczą o jej dobrym przygotowaniu do podjętych badań doświadczalnych. Doktorantka dobrze uzasadniła przedmiot badań i ich zakres. Zaprezentowała dane w oparciu o najnowsze publikacje.

Cel badań, a właściwie dwa cele Doktorantka przedstawiła szczegółowo i wyczerpująco. Pierwszy dotyczył oceny roli dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG_6236/MSMEG_6238 w globalnej regulacji metabolizmu u *M. smegmatis*. W realizacji tego celu podjęto zadania konstrukcji ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów: *msmeg_6236*, *msmeg_6238* oraz obu tych genów tj. *msmeg_6236/msmeg_6238*, zbadania tempa wzrostu skonstruowanych mutantów w obecności określonych źródeł azotu, węgla oraz oceny ich wrażliwość na wybrane związki m.in. antybiotyki, a także przeprowadzenie globalnej analizy transkryptomu uzyskanych mutantów w warunkach głodzenia węglowego. Drugi cel rozprawy to poznanie funkcji białka MtrA (*msmeg_1874*) w regulacji metabolizmu azotu u *M. smegmatis*. W tym zakresie przeprowadzono analizy oddziaływania białka His-MtrA z sekwencją promotorową genu *amtB* (*msmeg_2425*), którego produkt uczestniczy w transporcie amoniaku oraz tempa wzrostu mutantów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ w obecności wybranych źródeł azotu, a także przeprowadzenie analizy transkryptomu mutantów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ w warunkach głodzenia azotowego.

Materiał badawczy pracy doktorskiej mgr K. Struś stanowiły głównie szczepy z kolekcji Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* PAN w Łodzi, ale warto podkreślić, iż trakcie realizacji zadań badawczych doktoratu skonstruowano szereg szczepów *M. smegmatis*. Podłoża i ich składniki wymieniono w kolejnym rozdziale pracy - Materiały, podobnie zamieszczono tam wykaz syntetycznych oligonukleotydów wykorzystanych podczas realizacji badań, a była ich spora liczba, ze względu na specyfikę pracy. Kolejny

podrozdział stanowił zestawienie wektorów plazmidowych użytych w badaniach. Przedstawiono ich schematy oraz charakterystykę. Inne zestawienia (enzymów restrykcyjnych i innych enzymów, mieszanin reakcyjnych, buforów, odczynników, żeli i aparatury) także umieszczono w tym rozdziale. Opisy te nie budzą zastrzeżeń.

Realizacja badań wg założonego planu wymagała zastosowania wielu metod. Dobrano je właściwie i szczegółowo opisano w rozdziale 4 rozprawy - Metody. Szeroka paleta metod i technik badawczych stanowiła zapewne dla Doktorantki duże wyzwanie. Sądząc z uzyskanych danych wnioskuję, iż temu wyzwaniu sprostała. Opanowała je i właściwie wykorzystwała, tak metody hodowli prątków w różnych warunkach i na różnych podłożach, jak i różnorodne techniki genetyczne, molekularne i elektroforetyczne. Dobrze wykorzystwała możliwości, jakie stworzyła jej sposobność pracy w dwóch zespołach badawczych, w swojej jednostce macierzystej i Pracowni kierowanej przez Promotora pracy.

Doktorantka podjęła badania dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MnoSR, występującego w komórkach prątków *M. smegmatis*, nie mającego swojego odpowiednika u prątków gruźlicy. Składa się on z kinazy histydynowej MnoS (MSMEG_6238) oraz białka regulatora odpowiedzi MnoR (MSMEG_6236). Geny kodujące system MnoSR tworzą wspólny operon (*mnoSR*), a ich produkty biorą udział w regulacji metabolizmu metylotroficznego u *M. smegmatis*. Aby określić funkcje białek MnoS i MnoR w metabolizmie prątków, skonstruowano ukierunkowane, nieoznaczone mutanty *M. smegmatis* pozbawione genu *msmeg_6236*, *msmeg_623* lub obu genów równocześnie. Analiza kinetyki wzrostu tych szczepów na podłożach minimalnych zawierających zdefiniowane źródła węgla i azotu wykazała, że inaktywacja systemu MnoSR upośledza zdolność *M. smegmatis* do wykorzystania alkoholi takich jak 1,3-propandiol, metanol i etanol jako źródeł węgla, nie wpływa natomiast na zdolność wykorzystania większości mono- i disacharydów z wyjątkiem fruktozy. Nie stwierdzono zaś upośledzenia wzrostu tych szczepów na podłożu minimalnym, z różnymi organicznymi i nieorganicznymi źródłami azotu. Wyłączenie systemu MnoSR nie spowodowało zmiany wrażliwości *M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe, tetracykliny, etambutol oraz rifampicynę.

Aby wyjaśnić udział systemu MnoSR w globalnej odpowiedzi prątków na ograniczony dostęp do źródeł węgla, zastosowano metodę sekwencjonowania całkowitego RNA szczepu kontrolnego oraz mutantu $\Delta(mtrA/glnR)$, rosnących na podłożach z minimalnych dodatkiem różnych stężeń glukozy i 3-propandiolu, metanolu i etanolu. Wykazano, iż białka MnoS i MnoR wchodzące w system dwukomponentowy transdukcji sygnału są zaangażowane w procesy pozyskiwania węgla z alkoholi, takich jak 1,3

propandiol, metanol i etanol. Dane transkryptomocne wskazały też na ważną rolę MnoSR w metabolizmie pirogronianu, w tym jego znaczenia w metabolizmie energetycznym oraz procesach biosyntezy aminokwasów, puryn i pirymidyn u prątków. Pozbawienie prątków systemu MnoSR znajduje też odzwierciedlenie w zmianach ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm fruktozy, metanu oraz uczestniczące w szlaku pentozofosforanowym.

Drugi cel badań mgr K. Struś to wyjaśnienie roli regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotu u mykobakterii. Wstępnie założono, iż u tych drobnoustrojów białko GlnR (białko zaangażowane w regulację metabolizmu azotu, należące do czynników transkrypcyjnych z rodziny OmpR) oraz MtrA, mogą wiązać te same sekwencje regulatorowe i współuczestniczyć w regulacji genów, których produkty warunkują transport lub utylizację źródeł azotu. Konstrukcja podwójnego mutantu, pozbawionego genów obu badanych białek regulatorowych oraz analiza zdolności do wzrostu mutantów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ na podłożu minimalnym, zawierającym określone źródła azotu pozwoliła ustalić, że brak regulatora MtrA upośledza zdolność prątków do wykorzystania jako organicznych źródeł azotu niektórych aminokwasów. Przeprowadzona analiza danych transkryptomocnych szczepu kontrolnego oraz mutantów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ rosnących na podłożu minimalnym zawierającym siarczan amonu, pozwoliła zaobserwować zmianę ekspresji genów, których produkty mają udział w metabolizmie azotowym, w szczepach pozbawionych funkcjonalnego białka regulatorowego MtrA. Brak tego białka u mykobakterii, w warunkach głodzenia azotowego, wpływa na poziom ekspresji genów kodujących syntezę enzymów zaangażowanych w metabolizm argininy, puryn, tyrozyny, jak również szlaków przemian alaniny, asparagianu i glutaminianu.

Podsumowując, uzyskane przez mgr K. Struś wyniki badań pozwoliły na lepsze zrozumienie znaczenia roli systemu MnoSR w regulacji metabolizmu węglowego u prątków oraz regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotowego.

Rozdział przedstawiający wyniki pracy doktorskiej mgr K. Struś jest bogaty w ryciny, wykresy, schematy, tabele oraz dokumentację zdjęciową. Wszystko oceniam jako przemyślane i bardzo dobrze przygotowane. Właściwe wykorzystanie różnorodnego zestawu technik i metod badawczych pozwoliło jej uzyskać cenne i znaczące wyniki, które zostały starannie opracowane. Doktorantka zrealizowała podstawowe cele pracy. Pragnę podkreślić szeroki zakres pracy, różnorodność technik badawczych, który pozwolił jej uzyskać wartościowe wyniki.

Dyskusja wyników jest bardzo dobrze opracowana. Jest zwięzła, ale ujmuje najważniejsze aspekty pracy. Warto podkreślić odniesienie się Doktorantki do pracy, które ukazała się w czasie realizacji badań w ramach jej doktoratu, a które dotyczyła systemu MnoSR u prątków. Doktorantka wskazuje na pewną inspirację płynącą z tej pracy, do podjęcia badań alkoholi jako źródeł węgla dla badanych prątków. Dyskusja wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i jej umiejętności analizy dużej liczby danych.

Wnioski znajdują potwierdzenie w wynikach pracy. Biorąc pod uwagę jej zakres i liczbę uzyskanych danych, moim zdaniem wnioski sformułowano bardzo ostrożnie, może nawet nazbyt ogólnie.

Zestawienie literatury w liczbie 164 pozycji obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie.

Nie znalazłem w pracy informacji o dorobku naukowym Doktorantki. Oczywiście nie ma formalnego wymogu, aby przedstawiać szerzej osiągnięcia badawcze, ale od dłuższego już czasu doktoranci podają w rozprawach takie informacje. Mam nadzieję, iż wkrótce wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej mgr K. Struś zostaną opublikowane.

Poniżej uwagi i zapytania do Doktorantki.

1. Na str. 11 rozprawy Doktorantka, przedstawiając problemy z terapią gruźlicy wywołanej przez wielolekooporne prątki, napisała cytując: *Dodatkowo, negatywny wpływ zarówno na leczenie, jak i diagnostykę gruźlicy wywarła pandemia COVID-19. Sytuacja ta wymaga reorganizacji podjętych planów leczenia gruźlicy zarówno w skali krajowej jak i globalnej.* Bardzo proszę o bliższe wyjaśnienie tej kwestii.
2. Str. 18 – na jej końcu, wydaje mi się, że brakuje zakończenia zdania.
3. Na str. 158 (Dyskusja) Doktorantka zwróciła uwagę na potrzebę przeprowadzenia analizy ChipSeq, aby potwierdzić znaczenie regulonu MnoR, w obserwowanych zmianach w procesach metabolicznych, czy one wnikają z głodzenia węglowego, czy też z inaktywacji systemu MnoRS prątków. Czy taka analiza jest planowana w dalszych badaniach ?

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Katarzyny Struś pt. „Analiza funkcjonalna dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG6236/MSMEG6238 u *Mycolicibacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*)” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam, iż recenzowana praca jest wyróżniającą się. Wnoszę więc o wyróżnienie Doktorantki stosowną nagrodą.

Uzasadnienie:

Badania podjęte przez Doktorantkę są umiejscowione w niezwykle ważnym obszarze problematyki mikrobiologicznej i medycznej. Dotyczą prątków *Mycobacterium*. Poznanie procesów regulujących ich zdolność do przeżywania w różnych, zmieniających się warunkach środowiska, stanowią bardzo ważne, kluczowe zagadnienie. Wyjaśnienie tych procesów zapewne przyczyni się do ukierunkowania poszukiwania nowych celów molekularnych dla leków hamujących wzrost i przeżywanie prątków. Biorąc pod uwagę wielolekooporność tych patogenów, to dzisiaj jedno z kluczowych wyzwań przed jakimi stoi współczesna medycyna. Praca doktorska Mgr K. Struś mieści się w tym obszarze badań, a jej wyniki są znaczące, rozszerzające naszą wiedzę w tym obszarze dociekań naukowych.

A. Nosiński