



poniedziałek, 2 stycznia 2019

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Michała Sobali „Synteza nukleotydów sygnałowych [(p)ppGpp i (p)ppApp] przez enzym RSH z *Methylobacterium extroquens* AM1”.

Jednym z podstawowych mechanizmów umożliwiających przeżycie mikroorganizmom w środowisku jest ich zdolność adaptacji do zmieniających się warunków. Dotyczy to zarówno bakterii saprofitycznych, oportunistycznych czy też patogennych. Bakteria muszą szybko i właściwie reagować na bodźce środowiska poprzez globalne zmiany na poziomie regulacji ekspresji genów optymalizując wysiłek energetyczny do pojawiających się zagrożeń i możliwości. Adaptacja bakterii do zmieniających się warunków jest procesem ściśle regulowanym, zależnym od zdolności do odbioru zewnątrz- bądź wewnątrzkomórkowych sygnałów, które będą uruchamiać zmiany w poziomie ekspresji genów poszczególnych regulonów. Prawidłowa odpowiedź komórki na wystąpienie niedoborów w środowisku wzrostu regulowana jest przez wewnątrzkomórkowe alarmony takie jak tetra- oraz pentafosforany guanozyny będące elementami odpowiedzi ściślej stanowiącej przedmiot zainteresowania Doktoranta.

Pan Michał Sobala skoncentrował swoje badania na identyfikacji oraz charakterystyce biochemicznej nowego białka RSH u *Methylobacterium extroquens* odpowiedzialnego za syntezę alarmonów odpowiedzi ściślej w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Badania swe Doktorant mógł oprzeć o ogrom wiedzy i doświadczenia w badaniach odpowiedzi ściślej zgromadzony w poprzednich latach w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii z ogromnym udziałem promotora pracy, Pani dr hab. Katarzyny Potrykus.

Biorąc pod uwagę wciąż ograniczoną wiedzę o właściwościach białek regulujących odpowiedź ściśłą, w tym białek typu RSH, brak jakiegokolwiek wiedzy o regulacji odpowiedzi



ściślej u bakterii z rodzaju *Methylobacterium* cele badawcze postawione przed Doktorantem należy uznać za w pełni uzasadnione i niezwykle ciekawe.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący alarmonów odpowiedzi ściślej, enzymów syntetyzujących i hydrolizujących te alarmony a także charakterystyki bakterii z rodzaju *Methylobacterium*.

Wstęp pracy jest napisany bardzo ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również głęboko przemyślany i ściśle związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi Doktoranta.

W tym miejscu prosiłbym tylko Doktoranta o kilka wyjaśnień i uzupełnień. Schemat na str. 11 obrazuje wpływ (p)ppGpp na procesy fizjologiczne bakterii w tym na powstawanie komórek przetrwałych. Jednocześnie na tej samej stronie Doktorant pisze, że „Mimo początkowych doniesień o udziale (p)ppGpp w powstawaniu komórek typu persisters, najnowsze badania wskazują na brak zaangażowania odpowiedzi ściślej w powstawanie takich komórek u *M. smegmatis*”. Pierwotne badania pokazujące taką zależność były wykonane na modelu *E.coli* czy Doktorant uważa, że praca Bhaskara i wsp., może być interpretowana nie tylko pod kątem mykobakterii ? **Proszę Doktoranta o przedstawienie własnej opinii na ten temat na podstawie dostępnej literatury.**

Niezwykle ciekawe, również w aspekcie badań własnych opartych o analizę białka pozbawionego fragmentu N-terminalnego, są przytoczone przez Doktoranta dane literaturowe dotyczące wpływu domen regulatorowych w białkach RSH na ich aktywność enzymatyczną. **Czy obecna wiedza upoważnia do stwierdzenia, że białka RSH mogą posiadać różną aktywność w zależności od obecności lub braku domeny regulatorowej ? Jak tłumaczyć, że białko Rel_{sau} pozbawione domeny regulatorowej posiada przeciwstawną aktywność w *E.coli* oraz *S. aureus* ? Czy „tajemnicze” czynniki modulujące wspomniane przez autorów zostały już zidentyfikowane i opisane ?**

W rozdziale „Materiały i Metody” autor zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich



odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie całej gamy metod biochemicznych dla określenia właściwości badanego, rekombinowanego białka.

Część eksperymentalną autor rozpoczął od analiz *in silico* podobieństwa potencjalnego białka RSH badanego drobnoustroju oraz znanych białek RSH *E.coli* oraz *S. aureus*. Ze względu na stosunkowo niski stopień podobieństwa badanych białek autor wykonał również analizę sekwencji aminokwasowej centrum katalitycznego białek RSH wykazując, że badane białko posiada typową sekwencję pierwszorzędową tego regionu.

W dalszej części pracy Doktorant skoncentrował się na nadprodukcji i oczyszczeniu rekombinowanej formy enzymu RSH_{Mex}. Bardzo słusznym podejściem metodycznym było oparcie tej części pracy na syntetycznym, zoptymalizowanym pod kątem kodonów genie *rsh*. Założenia pracy obejmowały konstrukcje 4 układów ekspresyjnych pozwalających na nadprodukcję i oczyszczenie pełnej formy białka, domeny katalitycznej, syntetazy oraz hydrolazy. Jako układ ekspresyjny wybrano wektor z metką SUMO oraz komórki *E.coli* Rosetta. Nie do końca jest dla mnie zrozumiały brak możliwości sklonowania pełnej formy genu? **Czy autor próbował klonować pośrednich w wektorach do klonowania produktów PCR (np. pJet1.2), czy brane były pod uwagę inne wektory ekspresyjne dla pokonania powstałych trudności?** Znacznie większym wyzwaniem jest uzyskanie wydajnej ekspresji badanych białek w formie rozpuszczalnej. Przeprowadzona przez Doktoranta optymalizacja procesu pozwoliła na wydajne oczyszczenie homogenego białka domeny katalitycznej (1-352), nie udało się to natomiast dla białek domen hydrolazy i syntetazy. **Czy Doktorant próbował zastosować inne wektory ekspresyjne dla *E.coli* zawierające alternatywne metki (np. pGex) i/lub inne komórki gospodarza pozwalające na indukcję białka w bardzo niskich temperaturach (np. ArcticExpress)?** Należy podkreślić, że przeznaczone do badań biochemicznych białko RSH_{Mex}1-352 było pozbawione metki Sumo po odcięciu jej odpowiednią proteazą oraz oczyszczeniu w chromatografii metalopowinowactwa. Bardzo dobrze zaplanowane i wykonane analizy biochemiczne uzyskanego białka oparto głównie na jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej pozwalającej na obserwacje powstających nukleotydów. Ciekawą obserwacją Doktoranta było wykazanie, że badany enzym do optymalnej syntezy alarmonów wymaga kationów kobaltu a jego aktywność obserwowana jest również w wyższych stężeniach kationów magnezu. **Ciekawy jestem czy znane są stężenia obu kationów w komórkach bakterii i czy są one zbliżone do stężeń z optimum działania enzymu?** Autor



określił także optymalną temperaturę działania enzymu oraz wykazał brak aktywności hydrolitycznej w stosunku do tetra- i pentafosforanów guanozyny oraz adenozyiny. Do identyfikacji nukleotydów syntetyzowanych przez badany enzym Doktorant wykorzystał jedno- i dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową a także chromatografię jonowymienną, co pozwoliło jednoznacznie wykazać syntezę tetrafosforanu guanozyny oraz pentafosforanu guanozyny oraz adenozyiny. Szczególnie wykazanie zdolności enzymu RSH do syntezy (p)ppApp wydaje się cennym osiągnięciem poznawczym Doktoranta. Autor wyznaczył także stałą Michaelisa (K_m) badanego enzymu potwierdzając jego większe powinowactwo do ATP niż GTP. Przeprowadzone zostały także badania aktywności enzymatycznej *in vivo* w heterologicznym gospodarzu w oparciu o opracowany na potrzeby prowadzonych badań test z wykorzystaniem genu reporterowego *lacZ*. Przeprowadzone analizy wzrostu oraz ekspresji β -galaktozydazy a także testy komplementacji potwierdziły zdolność badanego enzymu do syntezy (p)ppGpp w warunkach *in vivo*. Wyniki te zostały potwierdzone poprzez chromatograficzną analizę (2DTLC) nukleotydów izolowanych ze szczepu noszącego, lub nie, transformowany plazmid zapewniający ekspresję RSH_{Mex}. Bardzo cenną obserwacją było także wykazanie, że „dzikie” szczepy *B. subtilis*, *M. extroquens* oraz *E. coli* syntetyzują zarówno tetrafosforan guanozyny jak i pentafosforan adenozyiny, a synteza tego ostatniego jest zależna w *E. coli* od obecności funkcjonalnego genu *relA*.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorant w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Wnioski wyciągnięte przez Doktoranta mają silne podstawy w prezentowanych wynikach i można uznać je jako w pełni uprawnione.

Czy na podstawie dostępnych obecnie informacji w literaturze naukowej oraz wyników własnych nie należałoby założyć, że pentafosforan adenozyiny działa antagonistycznie w stosunku do (p)ppGpp i służy raczej wyłączeniu odpowiedzi ścisłej w warunkach optymalnego wzrostu ? Prosiłbym Doktoranta o podjęcie dyskusji na ten temat podczas publicznej obrony.

Podsumowanie:



Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgr Michała Sobali uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek