



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

dziekanat.wb@uwr.edu.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl

Wrocław 05.08.2020

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz
Z-d Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski
Dagmara.jakimowicz@gmail.com

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bożeny Czubat pod tytułem
„Synteza witaminy B12 u mykobakterii”**

Recenzowana praca została wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod opieką prof. dr hab. Jarosława Dziadka i dr Aliny Minias w roli promotora pomocniczego. Temat pracy związany jest z realizacją grantu badawczego NCN, kierowanego przez dr Alinę Minias i dotyczącego roli witaminy B12 u mykobakterii. Realizacja pracy w zespole prof. Jarosława Dziadka, który od wielu lat zajmuje się biologią prątków, pozwoliła mgr inż. Bożenie Czubat wykorzystać jego bogate doświadczenie badawcze. Prowadzone w ramach pracy badania miały na celu nie tylko pogłębienie wiedzy na temat fizjologii prątków, ale także potencjalną identyfikację nowych strategii leczenia zakażeń spowodowanych przez te patogeny. Biorąc pod uwagę skalę zakażeń *M. tuberculosis* oraz rosnącą liczbę infekcji powodowanych przez prątki wielolekooporne przeprowadzone badania są w pełni uzasadnione.

Zgodnie z tytułem pracy mgr inż. Bożena Czubat skupiła się na roli białka MSMEG_4305 w biosyntezie witaminy B12 u *Mycobacterium smegmatis*. MSMEG_4305 to białko dwudomenowe, którego obie domeny mają zupełnie odmienne aktywności biologiczne. Połączenie tych dwóch domen w obrębie jednego białka stało się przedmiotem rozważań ewolucyjnych Doktorantki. Aby zbadać funkcjonalność obu domen uzyskano szereg

zmodyfikowanych szczepów i analizowano ich wzrost, zdolność do syntezy witaminy B12, aktywność RNazową oraz profil metaboliczny. Co więcej, Doktorantka określiła wpływ warunków środowiskowych na biosyntezę witaminy B12.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki można uznać wykazanie, że:

- biosynteza witaminy B12 zachodzi w komórkach mykobakterii w sposób zależny od czynników środowiskowych,
- w biosyntezie witaminy B12 uczestniczy domena CobC białka MSMEG_4305, podczas gdy domena N-końcowa ma aktywność RNAzy,
- budowa białka MSMEG_4305 złożonego z dwóch niezależnie funkcjonujących domen jest prawdopodobnie wynikiem dryfu genetycznego.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Obszerny Wstęp jest starannie napisany i stanowi rzetelne wprowadzenie do tematyki badań. Po wprowadzeniu dotyczącym *Mycobacterium*, Doktorantka przedstawia szlak biosyntezy witaminy B12, jak również inne szlaki metaboliczne powiązane z tą witaminą. Dokładne omówienie tak złożonych zależności metabolicznych stanowiło nie lada wyzwanie. W większości przypadków Doktorantka stanęła na wysokości zadania, ale jednak w niektórych momentach czytelnik może zgubić wątek. Tak dzieje się na przykład na stronie 33, gdzie pojawia się opis czynników związanych z resuscytacją i przebudową ściany komórkowej (RpfA) lub w momencie przedstawienia pułapki metylofolianowej, która moim zdaniem została opisana nieco pobieżnie. Czytelność Wstępu mogłoby także poprawić zamieszczenie dodatkowych rycin – na przykład przedstawiających strukturę kobalaminy czy schemat budowy białka MSMEG_4305. Pomimo powyższych uwag chciałabym jednak docenić starania Doktorantki włożone w przedstawienie tematu badań.

Cel pracy jest zwięźle sprecyzowany i zgodny z tematem pracy. Rozdział Materiały i Metody zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami zawiera tabele przedstawiające używane szczepy bakteryjne, opis wykorzystanych plazmidów oraz wykaz oligonukleotydów. Ponadto rozdział ten zawiera staranne zestawienie stosowanych procedur. W toku dalszej lektury pracy zauważyłam jednak, że niektóre procedury zostały potraktowane nieco skrótowo np. hodowle prątków w obecności sulfonamidów

Rozdział Wyniki rozpoczyna się od analiz bioinformatycznych. Stanowią one ciekawe wprowadzenie do pracy, ale dla osoby o ograniczonym doświadczeniu bioinformatycznym

mogą być nieco trudne w odbiorze. Dla lepszego zrozumienia pomocne byłoby szersze wyjaśnienie uzyskanych wyników a także zestawienie z analogicznymi analizami przeprowadzonymi dla kontrolnych genów np. niezbędnych. Kolejno, w dalszej części pracy, w celu identyfikacji potencjalnej roli białka MSMEG_4305 w biosyntezie kobalaminy Doktorantka przechodzi do analiz wpływu delecji genu *msmeg4305* na różne aspekty biologii modelowego organizmu, jakim jest *M. smegmatis*. W dalszych podrozdziałach Wyników opisuje zatem konstrukcję zmodyfikowanych szczepów i analizy ich wzrostu. Szczep pozbawiony MSMEG_4305 porównywany jest do szczepu pozbawionego CobIJ, enzymu kluczowego w typowym szlaku biosyntezy kobalaminy. Mutant delecyjny badany jest też w tle genetycznym szczepu $\Delta prpR$, w którym propionian metabolizowany jest za pomocą szlaku alternatywnego z wykorzystaniem enzymu wymagającego witaminy B12. Dla potwierdzenie wpływu delecji badanego genu na obserwowany fenotyp zastosowano szczepy komplementowane. Zestaw szczepów użytych do analiz jest dobrze przemyślany i zawiera wymagane kontrole a poprawność uzyskanych szczepów jest dobrze udokumentowana. W kolejnych częściach Wyników opisano analizy otrzymanych szczepów pod kątem rozmaitych aspektów ich fizjologii, w tym badania wzrostu na różnych podłożach i analizy długości komórek. Detektywistyczne poszukiwania efektów fenotypowych będących wynikiem wprowadzonych mutacji kontynuowano badając poziom witaminy B12 w różnych warunkach hodowli, wzrost bakterii w obecności sulfonamidów, a także poziom hybryd DNA/RNA celem zbadania wpływu delecji domeny C-końcowej na aktywność domeny RNAzowej białka MSMEG_4305. Dodatkowo przeprowadzono analizy fenotypowe (BIOLOG). Docenić należy próby rozwiązania problemu naukowego poprzez zastosowanie rozmaitych strategii i podejść eksperymentalnych. Rozdział Wyniki byłby jednak bardziej klarowny, gdyby Doktorantka pokusiła się o szersze wprowadzenie i omówienie kolejno wykonywanych eksperymentów w kontekście celu pracy i wcześniej uzyskanych wyników. Wprawdzie wprowadzenia tego typu pojawiają się w tym rozdziale (np. gdy zastosowano do analiz szczep pozbawiony genu *prpR* lub gdy badano wpływ głodu na poziom genów związanych z syntezą witaminy B12), ale w niektórych częściach Wyników ich brakuje (na przykład na stronie 93 w rozdziale 4.2.3 mogłoby pojawić się wytłumaczenie dlaczego mierzono długość komórek), co utrudnia czytelnikowi pełne zrozumienie strategii kolejno wykonywanych doświadczeń. Pomimo powyższych uwag uważam, że Doktorantka opisała w poprawny i rzetelny sposób kolejno wykonane eksperymenty.

Rozdział Dyskusja jest również bardzo obszerny i podzielony na podrozdziały, które zawierają przemyślane interpretacje przedstawionych wcześniej analiz zarówno biologicznych

jak i bioinformatycznych. Dojrzały tok prowadzenia Dyskusji oraz umiejętne odniesienie własnych obserwacji do danych literaturowych, a także fakt, że rozprawa została przygotowana została w oparciu o ponad 160 pozycji literaturowych, świadczą o doskonałym rozeznaniu Doktorantki w tematyce badań.

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o błędach redakcyjnych pojawiających się w rozprawie. Są to: dwukrotne pojawienie się rys. 1.3 i brak rysunku o numerze 1.2, brak odnośników do rysunków i tabel tekście (rys.3.4 i 3.5 i tab. 3.3. i 3.4). Niektóre rysunki w rozdziale Wyniki (np. rys. 4.22 na stronie 114) byłyby czytelniejsze, gdyby inaczej dobrano kolory. Ponadto warto zwrócić uwagę, że umieszczenie podpisów do rysunków bezpośrednio pod nimi zamiast na następnej stronie, znacznie ułatwiłoby ich analizę, choć oczywiście trzeba wziąć pod uwagę, że czasami jest to trudne do zredagowania.

Na koniec chciałabym przedstawić do dalszej dyskusji pytania, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy doktorskiej:

- Uzyskane wyniki wskazały na wpływ delekcji genu *msmeg_4305* na długość komórek i wpływ ten był zależny od witaminy B12 w podłożu. Nie zaobserwowano podobnego wpływu w szczepie z delecją $\Delta cobIJ$. Zaobserwowane wydłużanie komórek zostało zinterpretowane jako potencjalnie wynikające z nagromadzenia pośredniego produktu syntezy witaminy B12 w mutancie *msmeg4305 M. smegmatis*. Czy w takim razie suplementacja witaminą B12 niwelowałaby obserwowany fenotyp? Czy Doktorantka mogłaby zaproponować eksperyment weryfikujący swoją hipotezę?
- Moją wątpliwość wzbudziło także zastosowanie mutantu pozbawionego genu *msmeg4305* komplementowanego sama tylko domeną RNAzową. Nasuwa się pytanie, czy ten szczep rzeczywiście odpowiada szczepowi, w którym byłaby usunięta tylko domena C-końcowa *msmeg4305*? Czy Doktorantka mogłaby zaproponować metody weryfikacji i analizy potencjalnych różnic? Czy sprawdzano poziom nadprodukowanej domeny N-końcowej? Wyżej wspomniana modyfikacja została też przygotowana w tle genetycznym *rnhA*. Zaciekał mnie sposób konstrukcji tego mutantu a ponieważ nie znalazłam opisu w pracy proszę o wyjaśnienie w czasie publicznej obrony.
- Zaintrygowała mnie zależność pomiędzy poziomem witaminy B12 a warunkami wzrostu. Zaobserwowano wzrost poziomu witaminy B12 w warunkach głodzenia i wzrost ten był zależny od obecności genu *msmeg_4305*. Czy próbowano zatem określić

zmiany poziomu ekspresji genu *msmeg_4305* bądź aktywności kodowanego przez ten gen białka w warunkach głodu?

- Zastanawiałam się również nad sugerowanym brakiem wzajemnego wpływu obydwu domen białka MSMEG_4305 na swoją aktywność. Czy w tym wypadku również Doktorantka mogłaby zaproponować możliwą weryfikację tej hipotezy. Czy fizyczne rozdzielenie domen białkowych przy zachowaniu ich poziomu byłoby możliwe?

Na zakończenie pragnę zauważyć, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr inż. Bożeny Czubat wnosi istotny wkład w poznanie fizjologii prątków. Wspomniane powyżej pytania i uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Wysoko oceniam wybór strategii badawczych prowadzących do odpowiedzi na pytania badawcze. Podsumowując **uwzględam, że praca doktorska mgr inż. Bożeny Czubat w pełni odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom doktorskim i w związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

D. Jaluś

