

Prof. dr hab. Ewa Laskowska
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Jakuba Mikołaja Skibińskiego

„Identyfikacja niskocząsteczkowych związków hamujących aktywność wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori*”

Praca doktorska Pana mgr Jakuba Skibińskiego zatytułowana „Identyfikacja niskocząsteczkowych związków hamujących aktywność wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori*” została wykonana w zespole prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmieli z Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego we współpracy z Pracownią Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Pracownią Biochemii Białek i Kwasów Nukleinowych z Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Grupą Biologii Strukturalnej, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

W ostatnich latach skuteczność leczenia infekcji wywołanych przez *H. pylori* uległa znacznemu obniżeniu, głównie z powodu narastającej oporności *H. pylori* na najczęściej stosowane antybiotyki. Konieczne jest więc poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, co z kolei wymaga dogłębnego poznania mechanizmów umożliwiających przetrwanie *H. pylori* w środowisku i organizmie gospodarza. W tej pracy skupiono się na białkach związanych z metabolizmem RNA: fosforylaze polinukleotydowej PNP, helikazie RhpA oraz białku PapS. Do tej pory funkcja tych białek u *H. pylori*, ich rola w działaniu degradosomu RNA, zostały jedynie częściowo poznane. Podjęcie nowatorskich badań przez Doktoranta w tym zakresie było więc w pełni uzasadnione.

Rozprawa doktorska ma prawidłowo zorganizowaną formę manuskryptu, który zawiera: informacje wstępne, wykaz skrótów, spis treści, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, wnioski szczegółowe, wnioski końcowe oraz bibliografię. Bibliografia obejmuje 162 pozycje odpowiednio dobrane do tematyki rozprawy; są to prace w większości opublikowane w ciągu ostatnich kilku lat.

Wstęp dysertacji stanowi dobre, logicznie uporządkowane wprowadzenie do dalszej części pracy. Autor w wyczerpujący sposób przedstawia ogólną charakterystykę *H. pylori*, strukturę i funkcję degradosomu RNA z uwzględnieniem konkretnych białek zaangażowanych w metabolizm RNA.

Jako **cel pracy** wyznaczono zbadanie funkcji wybranych składników degradosomu *H. pylori*, ze szczególnym uwzględnieniem PNPazy - potencjalnego celu terapeutycznego, określenie funkcji PapS i weryfikację oddziaływania tego białka z RhpA. Wymienione w tym rozdziale szczegółowe zadania zostały w pełni zrealizowane, jak można się przekonać w dalszej części pracy. Jest jednak pewna niespójność dotycząca charakterystyki struktury PNPazy. Planowano identyfikację kluczowych domen funkcyjnych PNPazy, reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za aktywność enzymatyczną i oddziaływań z innymi elementami degradosomu. Takie analizy rzeczywiście wykonano, ale dla białka PapS. Natomiast w przypadku PNPazy ograniczono się do opisu ogólnej struktury tego białka na podstawie mikroskopii krioelektronowej.

Kolejne dwa rozdziały **Materiały** oraz **Metody** zostały przygotowane starannie i szczegółowo. Metody zostały odpowiednio dobrane do zadań badawczych i obejmowały: oczyszczanie rekombinowanych białek przy użyciu różnych technik chromatograficznych, konstrukcję szczepów delecyjnych *H. pylori*, analizę transkryptomów, Western blotting, mikroskopię krioelektronową, termoforezę mikroskalową, oraz szereg technik mikrobiologicznych. Ta obszerna lista wskazuje na duże doświadczenie laboratoryjne i umiejętność Doktoranta w planowaniu i prowadzeniu kompleksowych badań.

Wyniki zostały przedstawione w miarę logiczny i czytelny sposób: Doktorant uzyskał oczyszczone białka: PNPazę, RhpA i PapS oraz wyznaczył ich stopień oligomeryzacji, oznaczył aktywności enzymatyczne PNPazy i PAPs wykorzystując nowo-opracowaną metodę z zastosowaniem tioflawiny T. Stwierdził, że enzym PapS nie posiada klasycznej aktywności poliA-polimerazy, ale katalizuje dodawanie sekwencji CCA na końcu 3' tRNA. Wykazał ponadto, że PapS przejściowo oddziałuje z RhpA. Skonstruował mutanty delecyjne oraz szczep komplementacyjny $\Delta pnp++$; wykazał, że mutacja Δpnp wywołuje szereg efektów fenotypowych: m. in. hamowanie ruchliwości *H. pylori* i aktywności katalazy oraz ureazy, obniżenie przeżywalności w niskiej temperaturze i zwiększenie masy biofilmu. Analiza transkryptomiczna, wykazała, że spośród trzech badanych mutacji, $\Delta rhpA$ powoduje największe zmiany –nadekspresję prawie 160 genów związanych m.in. z naprawą DNA i metabolizmem wtórnym, oraz obniżoną ekspresję ponad 200 genów zaangażowanych m.in. w translację, chemotaksję, metabolizm azotu. Ostatnia część doświadczeń dotyczyła poszukiwania inhibitorów PNPazy. Korzystając z biblioteki ponad 8500 związków niskocząsteczkowych, Doktorant zidentyfikował 6 inhibitorów wzrostu *H. pylori*, w tym najbardziej skuteczny niklozamid, o wyraźnej aktywności zależnej od PNPazy. Tę część wyników oraz stwierdzenie, że PapS jest enzymem modyfikującym tRNA poprzez dodanie sekwencji CCA uważam za najważniejsze osiągnięcia tej pracy.

Mam kilka uwag dotyczących tej części rozprawy:

- W rozdziale 6.1.5 (Analiza form oligomerycznych białek metodą chromatografii żelowej) brakuje podsumowania. Wyniki uzyskane dla poszczególnych białek opisano co prawda bezpośrednio pod rycinami, ale byłoby wskazane umieszczenie podobnej informacji na zakończenie całego rozdziału.
- Ostatnie zdanie na stronie 91 jest chyba zbędne. Podobnie, rozdział 6.3.4, który nawiązuje do doświadczeń opisanych w dalszej części pracy (w rozdziale 6.9), znalazł się w tym miejscu prawdopodobnie przypadkowo.

- Ryc. 13a przedstawia pomiar aktywności polimeryzacyjnej PNPazy. Już w czasie 0 widać wyraźne różnice zależne od stężenia enzymu. Dalsza inkubacja w niewielkim stopniu zmienia wynik. Czy nie byłoby lepiej przedstawić końcowe wyniki tego doświadczenia (np. po 30 min inkubacji) w formie wykresu przedstawiającego zależność fluorescencji od stężenia białka?
- W opisie do Ryciny 18b napisano, że czerwony pasek „wskazuje na moment włączenia podgrzewania wiązką promieniowania podczerwonego, wywołującego zjawisko termoforezy”. Moment włączenia podgrzewania (uruchomienia lasera) to czas 0, a czerwony pasek z reguły wskazuje wybrany przedział czasowy w trakcie termoforezy, z którego odczytuje się dane do wyznaczenia stałej Kd.
- W opisach Tabeli 10 oraz rycin 36 i 37, przedstawiających wyniki RNAseq wspomniano o analizie wzbogacenia funkcjonalnego, którą badano za pomocą programu ShinyGO. W tabelach 10-12 umieszczono jedynie informacje do jakich grup funkcjonalnych przynależą zidentyfikowane geny. Warto było uzupełnić te dane korzystając np. z graficznych funkcji ShinyGO lub wyznaczyć dodatkowy parametr „fold enrichment” (krotność wzbogacenia).
- Z opisu doświadczeń dotyczących inhibitorów PNPazy (Rozdziały 6.8 i 6.9) nie wynika jasno, na którym etapie oznaczano wartości MIC dla badanych związków. W tekście (strony 134-135) odnotowano, że podczas etapu III, po którym wytypowano 23 związki, a następnie ponownie (?) podczas etapu IV. Należy zweryfikować również interpretację niektórych wyników. Napisano, że szczep Δpnp był bardziej wrażliwy na deoksyzakonię niż komórki WT i Δpnp^{++} , podczas gdy wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ były znacznie wyższe dla tego szczepu (>100, tabela 15), wskazywały więc na odwrotny efekt. Według tabeli 15, w przypadku eprotyromu i szczepu WT zanotowano takie same, a nie różne wartości MIC₅₀ i MIC₉₀.
- Uzasadnienie zastosowania, obok oznaczania fluorescencji, dodatkowej techniki elektroforezy w obecności mocznika (UREA-PAGE) do oceny aktywności PNPazy przedstawiono w rozdziale Metody. Zasadne byłoby jednak przeniesienie tej informacji lub jej krótkie powtórzenie na początku rozdziału 6.10, co ułatwiłoby zrozumienie celu doświadczenia. Przydatne byłoby również porównania wyników uzyskanych za pomocą tych dwóch metod oraz końcowe zestawienia (np. w formie tabeli) pokazujące, które z badanych związków rzeczywiście hamują aktywność PNPazy *in vitro* i ograniczają wzrost *H. pylori*.

Dyskusja stanowi dobre podsumowanie wyników w odniesieniu do aktualnej literatury. Potwierdza, że Doktorant jest specjalistą w swojej dziedzinie, posiada dużą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy wyników. Kończące pracę **Wnioski** w sposób klarowny podsumowują wszystkie osiągnięcia tej pracy jednocześnie nakreślając perspektywy dalszych badań.

Praca jest napisana poprawnym naukowym językiem. Pojawiło się jednak kilka błędów, np. nieprawidłowe stosowanie terminów „gęstość optyczna (OD)” i „absorbancja”. W rozdziale 6.6.4 (pomiar aktywności ureazy) w tekście, tabeli i na rycinie powinna być „Absorbancja” zamiast „OD”, a na Rycinie 29 i 30 „OD” zamiast „absorbancja”. Na stronach 134-135 poprawny zapis stężenia molowego to: 100 $\mu\text{moli/ml}$, 50 $\mu\text{moli/ml}$ itd. Termin „ekspresja białek” jako dokładne tłumaczenia „protein

expression” jest często uważany za niepoprawny w języku polskim – ekspresji ulegają geny, a białka są produkowane lub syntetyzowane.

Proszę aby w trakcie obrony Doktorant odpowiedział na pytanie dotyczącą analizy transkryptomicznej. Czy tło genetyczne może mieć wpływ na jej wynik? W doświadczeniach użyto dwóch różnych wyjściowych szczepów *H. pylori* 26695 (wprowadzono mutację $\Delta papS$) i G27 (Δpnp i $\Delta rhpA$). Czy zestaw genów różnicowych byłby podobny np. w *H. pylori* G27 $\Delta papS$ i *H. pylori* 26695 $\Delta papS$? Drugie zagadnienie dotyczy oddziaływań pomiędzy PapS i RhpA. Czy występowanie *in vitro* dodatkowych form oligomerycznych RhpA, oraz agregatów i produktów degradacji PapS, o których Pan wspomina w dyskusji, nie mogły wpłynąć na wynik termoforezy mikroskalowej (poprzez niespecyficzne oddziaływania lub hamowanie oddziaływań). Czy uzyskany wynik, można uznać za ostateczny, czy jednak warto zastosować inne metody badające oddziaływania białko-białko w komórce lub *in vitro*?

Podsumowując, Doktorant podjął się realizacji interesującego, a zarazem wymagającego zadania badawczego, obejmującego analizę funkcji białek zaangażowanych w metabolizm RNA oraz poszukiwanie inhibitorów PNPazy - potencjalnego celu terapeutycznego. W trakcie realizacji badań wykazał się rozległą wiedzą merytoryczną oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia prac badawczych. Warto podkreślić, że Pan Jakub Skibiński wykonując swoją pracę doktorską uczestniczył w realizacji projektu NCN Sonata Bis 9 oraz był kierownikiem projektu w ramach Doktoranckich Grantów Badawczych IDUB Uniwersytetu Łódzkiego 2023. Uzyskane wyniki są merytorycznie wartościowe, posiadają przy tym duży potencjał aplikacyjny. Są bardzo dobrym punktem wyjścia dla pełnego zrozumienia mechanizmów warunkujących przeżycie *H. pylori* w środowisku i organizmie gospodarza oraz dalszych doświadczeń zmierzających do opracowania nowej terapii skierowanej przeciwko *H. pylori*. Rozprawa Pana Jakuba Skibińskiego niewątpliwie stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego. Zamieszczone wyżej szczegółowe uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej oceny.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia kryteria określone w art. 187 ust 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr. Jakuba Mikołaja Skibińskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,

Ewa Laskowska