

PUBLICZNA OBRONA PRACY DOKTORSKIEJ

Dnia 18 czerwca 2012 r. o godz.13¹⁵

na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
w sali im. J. Czekanowskiego, parter
przy ul. Kuźniczej 35 (Katedra Antropologii)
odbędzie się publiczna obrona rozprawy doktorskiej

mgr inż. Katarzyny Gindy

pt.

**„Rola białka ParA w segregacji chromosomów i podziale
komórkowym *Mycobacterium smegmatis*.”**

Promotor **dr hab. Dagmara Jakimowicz**

Recenzenci **Prof. dr hab. Grażyna Jagura - Burdzy**
(PAN Warszawa, Instytut Biochemii i Biofizyki)

Prof. dr hab. Adam Jaworski
(Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)

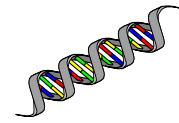
Praca do wglądu znajduje się w bibliotece Wydziału Biotechnologii przy
ul.Przybyszewskiego 63



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Zakład Genetyki Drobnoustrojów



Łódź, 2012. 04. 18

**Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy
pt. „Rola białka ParA w segregacji chromosomów i podziale komórkowym
Mycobacterium smegmatis”**

Temat i cele pracy

Praca doktorska mgr Katarzyny Gindy została zrealizowana w całości w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Dagmary Jakimowicz, w ramach dużego projektu badawczego Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ pt. „*Mechanizmy replikacji i segregacji chromosomów bakteryjnych - poszukiwanie nowych celów w terapii skierowanej przeciwko określonym patogenom Helicobacter pylorii i Mycobacterium tuberculosis*”.

Temat i cele pracy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy mieszczą się w głównym kierunku znanych w Europie i w Świecie poszukiwań naukowych Zespołów prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej - Czerwińskiej i dr hab. Dagmary Jakimowicz z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz prof. dr hab. Jarosława Dziadka z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, owocnie współpracujących w molekularnych badaniach kwasoodpornych prątków. Kierunkowym celem tych badań poznawczych jest poszukiwanie i identyfikacja tarcz molekularnych dla syntezy nowych leków, które byłyby skuteczne w terapii ludzi zakażonych szczepami/klonami *Mycobacterium tuberculosis* opornymi na dotychczas stosowane tuberkulostatyki. Należy w tym miejscu dodać, że od bardzo wielu lat nie wprowadzono do leczenia gruźlicy, niestety, nowych leków, a stąd wciąż narasta zagrożenie związane z pojawianiem się i transmisją szczepów/klonów opornych na większość, a nawet wszystkie dotychczas stosowane leki w leczeniu gruźlicy. Cele pracy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy zostały podporządkowane wyjaśnieniu w jakim stopniu gen *parA* i jego produkt białko ParA są istotne bądź niezbędne dla prawidłowej segregacji chromosomów w komórkach kwasoodpornych prątków. Badania przeprowadzono na modelu nie patogennych, szybko rosnących komórek *Mycobacterium smegmatis*, gatunku filogenetycznie pokrewnego patogennym bakteriom *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium leprae*. W uzasadnieniu celu pracy Doktorantka pisze, że „u większości bakterii segregacja zachodzi w sposób aktywny z udziałem białek ParA (ATPazy) i białka ParB (białko wiążące DNA)” i dalej stwierdza „jak dotąd opisano jedynie udział białka ParB w cyklu życiowym i segregacji chromosomów w komórkach *M. smegmatis*”. Co więcej, ważnym, dodatkowym uzasadnieniem dla podjęcia badań roli biologicznej białka ParA na modelu *Mycobacterium smegmatis* były dane literaturowe z 2010 roku wskazujące, że obniżenie poziomu tego białka prowadzi do znacznego spowolnienia wzrostu. Podzielałam pogląd Doktorantki, że bliższe poznanie udziału tego białka w cyklu rozwojowych mykobakterii może stworzyć szansę na opracowanie specyficznych inhibitorów, dla których celem molekularnym byłoby białko ParA. Ten ambitny cel kierunkowy realizowano przy zastosowaniu nowoczesnego warsztatu naukowego, który współcześnie jest wprzęgany w ważne badania poznawcze w dziedzinie inżynierii genetycznej i biologii molekularnej bakterii, w tym tak trudnych obiektów jakimi są bakterie z rodzaju *Mycobacterium*.

Dobrze przemyślane cele cząstkowe pracy sprowadzały się do:

- Po pierwsze, ustalenia, wpływu inaktywacji (delecji) genu *parA* jak też jego nadekspresji na segregację chromosomów, podziały i wzrost komórek.
- Po drugie, określenie subkomórkowej lokalizacji białka *ParA* w porównaniu z lokalizacją białka *ParB*.
- Po trzecie, zbadania wewnątrzkomórkowych oddziaływań białka *ParA* z wierzchołkowym białkiem *Wag31* (*DivIVA*).

Część teoretyczna pracy (Wstęp)

Wstęp pracy doktorskiej (31 stron wydruku komputerowego) został przygotowany, podobnie jak cała praca, starannie zarówno pod względem formalnym jak i języka naukowego.

Treści naukowe zawarte w tym rozdziale są ściśle podporządkowane tematowi i celom pracy doktorskiej. W pierwszym podrozdziale części teoretycznej pracy Doktorantka przedstawiła najnowsze dane literatury światowej, w tym osiągnięcia w tej dziedzinie Zespołów prof. dr hab. Jolanty Czerwińskiej - Zakrzewskiej i dr hab. Dagmary Jakimowicz, na temat cykli życiowych różnych, modelowych gatunków bakterii gramujemnych i gramododatnich, w tym mechanizmów replikacji i segregacji chromosomów, udziału białek komórkowych biorących udział w segregacji chromosomów i w podziałach komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli białek chromosomalnych *ParA* i *ParB*. Zaś w drugim, zwartym podrozdziale przedstawiła ogólną charakterystykę bakterii z rodzaju *Mycobacterium* oraz wciąż mało poznane mechanizmy segregacji chromosomów i podziałów komórkowych mykobakterii, a także nadal skąpe dane na temat udziału/roli w tych procesach białek *ParA* i *ParB*. Również w tym podrozdziale cytowane są ważne wyniki prac doświadczalnych, opublikowanych w ostatnich latach, przez współpracujące ze sobą Zespoły prof. dr hab. Jolanty Czerwińskiej - Zakrzewskiej, dr Dagmary Jakimowicz oraz prof. dr hab. Jarosława Dziadka.

W tym miejscu chcę powiedzieć - „tak należy trzymać”, bo jedna ze słabości nauki polskiej, obok niewystarczających nakładów finansowych (jednak z czasem poprawianych i korygowanych w dobrym kierunku), jest brak dobrze rozumianej współpracy „silnych z silnymi”, ale także z nieco słabszymi, a także izolacjonizm w myśl złej zasady „każdy sobie małą rzepkę skrobie”, bo nie ma potrzeby opracowywać projektów na miarę dużych wyzwań nie ma potrzeby konkurować z najlepszymi. Śledząc uważnie aktywność naukową Zespołów prof. dr hab. Jolanty Czerwińskiej - Zakrzewskiej, dr hab. Dagmary Jakimowicz oraz prof. dr hab. Jarosława Dziadka oraz wartość odważnie podejmowanych projektów badawczych, a także bardzo wartościowe, oryginalne wyniki publikowane w wiodących, specjalistycznych czasopismach naukowych świata - przedstawiam tak rozumianą i dobrze ułożoną współpracę naukową w dziedzinie nauk biologicznych za wzór do szerszego naśladowania w Polsce.

Materiały i Metody

Nie mam żadnych uwag krytycznych do tego rozdziału, opracowanego bardzo skrupulatnie, dokładnie i tak, by procedury, metody i techniki zastosowane w ocenianej pracy doktorskiej mogły być również zastosowane i weryfikowane w innych laboratoriach i ośrodkach, zajmujących się podobną problematyką badawczą. Tak jak napisałem nieco wcześniej w realizację postawionych celów poznawczych „wprzęgnięto” bardzo nowoczesny i adekwatny do skali trudności „warsztat badawczy” - w postaci nowoczesnych metod i technik badawczych dla badań molekularnych bakterii na poziomie genomiki, inżynierii genetycznej, proteomiki, lokalizacji i regulacji syntetyzowanych wewnątrzkomórkowych białek oraz ich oddziaływań w warunkach *in vivo*. Zastosowano także nowe, bardzo informatywne techniki fluorescencyjne, w tym metodę mikroprzepływowej mikroskopii dla bardzo precyzyjnych analiz morfologicznych i fizjologicznych pojedynczych i całych populacji komórek bakteryjnych.

Wyniki

Z zamieszczonej na stronie 191 pracy informacji wynika, że dorobek naukowy mgr Katarzyny Gindy obejmuje współautorstwo dwóch opublikowanych prac, w tym jednej eksperymentalnej (*Molecular Microbiology*, 2010) i jednej przeglądowej (*Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2011). Druga zespołowa praca doświadczalna, w której jest pierwszym autorem, jest na ostatnim etapie przygotowywana do publikacji. Sądząc, z tytułu tej pracy, będzie ona zawierać wyniki i wnioski z recenzowanej pracy doktorskiej opracowanej w postaci monografii. Piszę o tym dlatego, że praca doktorska

mgr Katarzyny Gindy mogłaby być zapewne wkrótce opracowana pod rządami nowej Ustawy o Stopniach i Tytułach naukowych jako zbiór tematycznie spójnych trzech opublikowanych prac, co coraz częściej jest dobrą praktyką także w Polsce.

Obszerny rozdział *Wyniki* (65 stron wydruku) został bardzo dobrze zorganizowany i starannie opracowany. Co jednak najważniejsze, uzyskane rezultaty na kolejnych etapach realizacji nakreślonych celów pracy zostały świetnie udokumentowane w postaci bardzo licznych rysunków, tabel, wykresów, zdjęć elektroforetycznych rozdziałów fragmentów DNA oraz analizowanych białek. Szczególnie ujęły mnie piękne, bardzo czytelne zdjęcia z mikroskopii fluorescencyjnej, pokazujące lokalizację i kolokalizację badanych białek *Mycobacterium smegmatis*, a także zdjęcia lokalizacji segregosomów w czasie, uzyskane przy pomocy techniki mikroprzepływowej mikroskopii fluoroscencyjnej.

Nie jestem w stanie ocenić bardzo szczegółowo „morza” wyników przedstawionych i omówionych w trzech podrozdziałach tej pracy **5.1**, **5.2** i **5.3**, dotyczących, odpowiednio, „*Wpływu białka ParA na wzrost i segregację chromosomów M. smegmatis*”, „*Lokalizacji tego białka w komórkach*” oraz „*Analizy oddziaływań białka ParA z białkiem DivIVA- regulatorem wzrostu wierzchołkowego*”. Stąd, ograniczę się do oceny zaledwie niektórych wyników, która dla mnie są interesujące i zgodnie z moją wiedzą należy ich zaliczyć do oryginalnych.

Zacznę jednak od tego, że jedną z podstaw i jednym z warunków dla uzyskania wyników opisanych w podrozdziale **5.1** była konstrukcja odpowiednich, dobrze zaplanowanych mutantów *Mycobacterium smegmatis* mc²: mutanta defektywnego noszącego inaktywowany gen *parA* (Δ *prA*) w szczepie KG22; mutantu zdolnego do nadekspresji białka ParA, noszącego gen *parA* pod kontrolą indukcyjnego promotora acemidowego w szczepie KD11; mutantu pozbawionego zdolności syntezy obu białek ParA i parB, noszącego zainaktywowane oba geny (*aparAB*). Rezultaty opisane w podrozdziale **5.2**, dotyczące lokalizacji i kolokalizacji badanych białek w komórkach *M. smegmatis* uzyskano na modelu kolejnych skonstruowanych szczepów, zdolnych do ekspresji fuzyjnych białek ParA i ParB z fluorescencyjnym białkiem EGFP, odpowiednio (EGFP-ParA i EGF-ParA^{minus} - EGFP-ParB). Natomiast wyniki dotyczące wpływu białka ParA na lokalizację segregosomów otrzymano dzięki konstrukcji innych szczepów, w których białko ParA jest ekspresjonowane w postaci fuzji z innym fluorescencyjnym białkiem mCherry (szczepy Δ *paraA-parB-mcherry* oraz *egfp-parA-parBmcherry*). W podrozdziale **5.3** przedstawiono zaś wyniki na temat oddziaływań białka ParA z białkiem wierzchołkowym DivIVA, które uzyskane na modelu kolejnych skonstruowanych szczepów, zdolnych do syntezy fuzyjnego białka DiVIA-mCherry (szczepy *egf-parA/divIA-mcherry* i Δ *paraA/divIVA-mcherry*). Uzyskane obserwacje wzbogacano, uzupełniono dodatkowo wynikami otrzymanymi przy pomocy bakteryjnego systemu dwuhybrydowego, nie tylko z wykorzystaniem całego białka DiVIA, ale także jego określonych domen.

Resumując, realizacja jedynie tego etapu pracy doktorskiej, to jest konstrukcja kilkunastu dobrze zaplanowanych, a następnie dokładnie scharakteryzowanych, modelowych szczepów pochodnych Mycobacterium smegmatis mc², zasługuje na uznanie z racji zarówno biegłości warsztatowej Doktorantki w inżynierii genetycznej jak też wkładu włożonej przez Nią pracy.

Na kolejnych etapach pracy mgr Katarzyna Ginda przeprowadziła bardzo wiele złożonych eksperymentów zarówno *in vivo* jak i *in vitro* w poszukiwaniu odpowiedzi na postawione pytania o rolę biologiczną białek ParA, ParB i DivIVA w cyklu życiowym *Mycobacterium smegmatis*. Wiedza, ogromne doświadczenie w dziedzinie replikacji, segregacji chromosomów i regulacji podziałów komórkowych bakterii Pani Promotor i Jej współpracowników z Zakładu Mikrobiologii Molekularnej oraz nowoczesna aparatura dostępna w Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, a także w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, poparte pracą i pasją naukową Doktorantki, przyniosły bardzo znaczące, w tym oryginalne wyniki o charakterze poznawczym. Do najważniejszych rezultatów, które zapewne wkrótce zostaną opublikowane w specjalistycznym „rankingowym” czasopiśmie naukowym zaliczam:

- *Wykazanie, że białko ParA jest aktywnie zaangażowane w segregację chromosomów Mycobacterium smegmatis, bowiem inaktywacja genu kodującego jego syntezę prowadzi do głębokich zaburzeń w segregacji chromosomów, a w konsekwencji do istotnych zmian morfologicznych komórek i znacznego hamowania szybkości wzrostu hodowli; ma również wpływ na prawidłową lokalizację przegród w czasie podziałów oraz na wydłużanie komórek.*

- Sformułowanie w pełni uprawnionej hipotezy, zilustrowanej w rozdziale Dyskusja na rys. 6.1, że białko ParA oddziałuje z kompleksami ParB-DNA i warunkuje aktywny rozdział segregosomów w komórkach tuż po podwojeniu regionu oriC

- Udowodnienie, po raz pierwszy, przy pomocy dwóch niezależnych metod, że białko ParA *Mycobacterium smegmatis* oddziałuje bezpośrednio z wierzchołkowym regulatorem wydłużania komórek *Mycobacterium DivIVA*.

Pięknie opracowany przez Doktorantkę schemat, przedstawiony na 171 stronie pracy doktorskiej (rys. 7.1), stanowi ilustrację, a zarazem bardzo dobre podsumowanie wszystkich uzyskanych wyników o bezpośrednim lub pośrednim udziale białka ParA w różnych procesach cyklu życiowego komórek *Mycobacterium smegmatis*.

W tym miejscu mam tylko jedno pytanie do mgr Katarzyny Gindy: *Czy w świetle uzyskanych własnych, bardzo wiarygodnych wyników o roli biologicznej białek ParA, ParB i DivIVA w komórkach modelowego gatunku Mycobacterium smegmatis, a także w świetle obecnej wiedzy o udziale tych białek w regulacji cyklu życiowego i w podziałach komórkowych prątków gruźlicy, czy innych gatunków chorobotwórczych mykobakterii dla ludzi i zwierząt - dostrzega szansę, że te białka lub kodujące ich syntezy geny mogą być rozważane jako molekularne tarcze dla poszukiwania i syntezy nowych leków podstawowych lub wspomagających w terapii zakażeń?*

W zakończeniu mojej oceny pragnę podkreślić wartość rozdziału Dyskusja, opracowanego przez mgr Katarzynę Gindę w sposób może nietypowy, ale naukowo profesjonalny. Tytuły kolejnych podrozdziałów Dyskusji są w istocie wnioskami końcowym pracy: „*ParA wpływa na segregację chromosomów i podziały komórkowe*”, „*ParA wykazuje dynamiczną lokalizację i wpływa na położenie kompleksów ParB w komórkach M. smegmatis*”, „*ParA oddziałuje z DivIVA- regulatorem wzrostu wierzchołkowego*”. W każdym z tych podrozdziałów Doktorantka dyskutuje i konfrontuje własne wyniki i sformułowane na ich podstawie wnioski z rezultatami innych autorów, obficie cytując najnowsze dane dobrze dobranej literatury światowej na temat roli badanych białek oraz molekularnych mechanizmów kontrolujących segregację chromosomów i podziały komórkowe u innych gatunków i rodzajów bakterii. Dla mnie była to bardzo pouczająca lektura zważywszy, że cykle życiowe różnych gatunków i rodzajów bakterii, ziarniaków i pałeczek, zdolnych i nie zdolnych do sporulacji, są bardzo złożone, a molekularne mechanizmy ich podziałów komórkowych, jak się okazuje w świetle współczesnej wiedzy, są niezwykle złożone i dalekie od pełnego wyjaśnienia i zrozumienia.

Wnioski końcowe

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy, w tym szczególnie wartości oryginalnych wyników oraz ważnych wniosków o charakterze poznawczym stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Gindy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia pracy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy z uwagi na rangę przeprowadzonych badań oraz wysoką wartość uzyskanych wyników, w tym nowych, oryginalnych wyników o charakterze poznawczym, które w moim przekonaniu zostaną w bieżącym roku opublikowane w bardzo dobrym specjalistycznym czasopiśmie, a tym samym będą upowszechnione w międzynarodowym obiegu naukowym.

Prof. dr hab. Grażyna Jagura-Burdzy
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a,
02-106 Warszawa

Warszawa 29.05.2012

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Gindy

„Rola białka ParA w segregacji chromosomów i podziale komórkowym *Mycobacterium smegmatis*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w zakładzie Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką dr hab. Dagmary Jakimowicz od lat zajmującej się problemem segregacji chromosomów bakteryjnych u promieniowców i udziału w tym procesie białek z rodzin ParA i ParB. Wybranie jako obiektu badań *M. smegmatis* jest uzasadnione jego podobieństwem do groźnych patogenów ludzkich *M. tuberculosis* i *M. leprae*. Zrozumienie procesu podziału komórkowego stwarza możliwości interferencji z tym procesem i skuteczniejsze eliminowanie bakterii chorobotwórczych. Poprzednie prace zespołu dotyczyły funkcji białka ParB u *M. smegmatis*, recenzowana rozprawa poświęcona jest jego partnerowi ParA.

Chromosomalnie kodowane białka ParA (ATPazy typu Walkera) i białka ParB wiążące DNA (rozpoznające ściśle konserwowane sekwencje zwane sekwencjami centromerowymi *parS*) są produkowane przez prawie wszystkie bakterie [z nielicznymi wyjątkami rodzin *Enterobacteriaceae* (e.g., *E. coli*), *Pasteurellaceae* (e.g., *Haemophilus influenzae*), czy Firmicutes (e.g., *Mycoplasma* sp.)]. Ich rola w badanych gatunkach nie ogranicza się do udziału w prawidłowej segregacji chromosomów (ukierunkowanego, aktywnego przemieszczenia się domen *oriC* noworeplikowanych chromosomów do biegunów komórek) ale wydają się one uczestniczyć w koordynacji innych istotnych procesów komórkowych, t.j. częstości inicjacji replikacji poprzez interakcje z DnaA, kondensację chromosomów poprzez interakcje z białkami SMC (structural maintenance of chromosomes), podziałów komórkowych poprzez pośredni lub bezpośredni wpływ na tworzenie się pierścienia FtsZ, czy regulacji sporulacji, ruchliwości bakterii i zdolności do tworzenia biofilmów. Udział białek Par w poszczególnych procesach komórkowych jest gatunkowo specyficzny i dlatego istotne wydaje się badanie ich roli w różnych gatunkach bakterii. Mimo tak szerokiego zaangażowania białek Par w rozmaite ważne dla przeżycia komórek procesy, mutanty w genach *par* nie są zazwyczaj letalne (z wyjątkiem *Caulobacter crescentus* i *Mycobacterium tuberculosis*) sugerując, że mikroorganizmy wykształciły więcej niż jeden system kontroli podstawowych procesów życiowych.

Autorka rozprawy mgr Katarzyna Ginda podjęła się weryfikacji doniesień o letalności delekcji genu *parA* u *M. smegmatis* a także zbadania efektów nadprodukcji białka ParA, ustalenie lokalizacji ParA w komórkach, wpływu ParA na lokalizację ParB i sprawdzenie hipotezy o oddziaływaniach ParA z homologiem białka DivIVA. Ponieważ uzyskany przez doktorantkę mutant delecyjny *parA* okazał się żywotny przeprowadzono fenotypową charakterystykę takiego szczepu *M. smegmatis*.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. **Wstęp** jest w moim odczuciu zbyt ogólnikowy w części dotyczącej białek Par, znacznie lepszy w części dotyczącej charakterystyki *Mycobacterium*.

Najwięcej uwag redakcyjnych mam do rozdziału **Materiały i Metody**, który zajmuje 52 strony a więc niewiele mniej niż rozdział Wyniki (67 stron). Uderzają nadmiernie szczegółowe opisy metod standardowych, konstrukcji plazmidów i szczepów. Podawanie składów buforów (w bardzo przejrzystych i zajmujących dużo miejsca tabelach) czy składów żeli poliakrylamidowych rozdzielających i zagęszczających do elektroforezy białek nie jest konieczne w pracach doktorskich, wystarczy odnośnik literaturowy (Sambrook *et al.*, 1989). Dodatkowo rozdział ten jest rozszerzony o 8 załączników, w których znalazły się schematy map plazmidów komercyjnych czy powszechnie stosowanych np. GEM-T-Easy czy wektorów systemu dwuhybrydowego BACTH. Wydaje mi się, że zamiast nich można byłoby tu przenieść z M&M bardzo szczegółowe rysunki poszczególnych plazmidów skonstruowanych przez autorkę. Uderzające jest, że ani w opisach plazmidów w Tabeli 4.3 ani w rysunkach w załącznikach autorka nie podaje informacji o rodzaju origin replikacji co jest podstawą funkcjonowania plazmidu w danym gospodarzu. Załączniki 6 i 7 to wyniki analizy hybrydyzacyjnej skonstruowanych mutantów delecyjnych i insercyjnych chromosomu *M. smegmatis*. Słusznie uznano, że te wyniki nie muszą znajdować się w głównej części pracy. Szkoda, że nie trzymano się tego konsekwentnie. Zamieszczenie wszystkich rysunków i zdjęć żeli z produktami PCR potwierdzającymi poprawność konstrukcji mutantów w tych załącznikach zapewniłoby większą spójność rozdziału Wyniki. Oprócz sekcji Załączników jest jeszcze w rozprawie sekcja Suplementów 1 i 2. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawione w Suplemencie 2 są bardzo interesujące, doskonały pomysł dla takiej prezentacji wyników. Moje wątpliwości zasadność Suplementu 1, który w pierwszej części zawiera szczegółowo opisaną procedurę oczyszczania białek ParB i DivIVA standardowymi metodami. Jest to w dużym stopniu duplikacja informacji zawartej w M&M. Druga część Suplementu 1 to wyniki oznaczeń aktywności ATPazowej białka ParA, m.in. wpływ obecności ParB na aktywność ATPazy, zależność od temperatury czy jonów dwuwartościowych i jako „wyniki” dyskutowane później w Dyskusji powinny znaleźć się w rozdziale Wyniki. Drobną uwagę dotyczy opisu pochodzenia szczepów bakteryjnych wziętych z „zasobów” ZMM UW, takich jak DH5 α , BL21 czy BTH101, wymagane jest mimo wszystko podanie pierwotnych referencji czy źródła komercyjnego.

Aby zakończyć z uwagami redakcyjnymi muszę jeszcze wspomnieć o niezbyt starannym złożeniu przysłanej do recenzji rozprawy np **Streszczenie** znalazło się w środku spisu treści, a str 98 kończy się urwanym zdaniem. Cytowania literaturowe podawano w sposób bardzo oryginalny, autorka wymienia nazwiska dwóch pierwszych autorów i wsp, (np. Ptacin, Lee i wsp) zamiast powszechnie stosowanego

pierwszego autora i wsp.,

Rozdział **Wyniki** jest bardzo przejrzysty, graficznie na bardzo wysokim poziomie. Kolejne podejmowane zagadnienia są logicznie uzasadnione i spójne. Jest to niewątpliwie najlepsza część rozprawy. Autorka skonstruowała szczepy delecyjne w genach *parA* i *parAB*, włączyła w inne miejsce chromosomu gen *parA* wyrażany z naturalnego promotora lub indukowanego acetamidem (komplementacja albo warunki nadprodukcji ParA). Tak skonstruowane szczepy były badane w testach wzrostowych i poprzez obserwacje mikroskopowe. Autorka wprowadziła w locus *parA* fuzję translacyjną *egfp-parA* zarówno w szczepie dzikim jak i mutancie *parB* a także skonstruowała szczep produkujący fluorescencyjne pochodne obu białek Par : *egfp-parA-parB-mcherry*. Pozwoliło to na śledzenie lokalizacji białek Par i ich wzajemne zależności. Podobną funkcję miało skonstruowanie szczepów z fuzją *divIVA-mcherry* w obecności i braku *parA* oraz *egfp-parA*. Bardzo ciekawe dane uzyskano z mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej (doświadczenia wykonane we współpracy z prof. J. McKinney, EPFL w Szwajcarii). Interpretacja tych danych pozwoliła na stworzenie obrazu czasowo-przestrzennego dla białek Par. Po podziale komórki ParA lokalizuje się w pobliżu nowo powstałego bieguna. Gdy w centralnej części komórek zachodzi podział segrosomów (replikacja DNA), ParA oscyluje w przestrzeni między tym biegunem a centralną częścią, uczestniczy w dynamicznym, aktywnym rozdziale segrosomów i przemieszczeniu się jednego z nich w pobliże „nowego” bieguna. Unieruchomienie jednego z segrosomów na biegunie przy aktywnym przemieszczaniu się drugiego obserwowano poprzednio np. dla *C. crescentus*. Oscylacjom ParA między biegunem a centrum komórki towarzyszą ograniczone tą przestrzenią ruchy segrosomu. W dalszym etapie cyklu ParA przemieszcza się czasowo do „starego” bieguna a następnie gromadzi się w miejscu tworzącej się septy podziałowej i pozostaje tam do podziału komórkowego. Przy braku ParA powstaje więcej segrosomów, przegrody komórkowe tworzone są w nietypowych lokalizacjach, segrosomy dzielą się w różnych punktach komórki, poruszają się powoli w sposób niekontrolowany i najczęściej lokalizują na obrzeżach komórek. Obraz ten sugeruje wpływ ParA na inicjację replikacji, lokalizację fabryk replikacyjnych, determinowanie miejsca wytwarzania się sept podziałowych i ukierunkowany, aktywny rozdział segrosomów do zdefiniowanych pozycji wewnątrz komórki. Sugestie te na pewno wymagają dalszych weryfikacji, można jednak zakładać, że jeśli ParA rzeczywiście uczestniczy w tak różnych procesach to poprzez oddziaływania z różnymi białkami komórkowymi.

Najważniejsze w mojej opinii odkrycie doktorantki to wykazanie takich bezpośrednich oddziaływań między ParA *M. smegmatis* a DivIVA, regulatorem wzrostu wierzchołkowego u tych bakterii. Oddziaływania zostały zademonstrowane w systemie BACTH i *in vitro* metodą współczyszczania na kolumnach. W systemie BACTH wykazano też podobne oddziaływania między białkami ParA i DivIVA u *M. tuberculosis*, krzyżowe oddziaływania między ParA i DivIVA pochodzącymi z *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* oraz brak oddziaływań z homologami z innych promieniowców t.j. *Corynebacterium glutamicum* czy *Streptomyces coelicolor*. Wydaje się więc, że oddziaływania te są rodzajowo specyficzne i mogą stać się potencjalnym celem leków terapeutycznych. Interakcje białek typu ParA z homologami

DivIVA w innych organizmach były już demonstrowane np dla *B. subtilis* gdzie zaangażowanie DivIVA w lokalizację sept podziałowych odbywa się poprzez determinowanie lokalizacji białek MinCD a tym samym miejsca tworzenia pierścienia FtsZ. Rola DivIVA w *M. smegmatis* jest całkowicie różna (brak homologów MinCD). DivIVA jest zlokalizowane symetrycznie na obydwu wierzchołkach komórki to dlaczego ParA (postulowana funkcja DivIVA to kotwiczenie ParA) jest przez długi czas cyklu komórkowego zlokalizowane w pobliżu tylko „nowopowstałego bieguna?

W modelach działania systemów partycyjnych opartych na białkach ParA, ATPazach typu Walkera, ParB jest induktorem aktywności ATPazowej co w rezultacie prowadzi do depolimeryzacji filamentów ParA. Autorka wykazała, że białko ParB *M. smegmatis* hamuje aktywność ATPazy ParA a mimo to w dyskusji czytamy: „Te wyniki wskazują, że w komórkach *M. smegmatis* tak jak sugerowano dla innych bakterii oddziaływanie z ParB może prowadzić do destabilizacji struktur ParA”. Co autorka przez to rozumie? Niespecyficzne oddziaływania ParA z DNA są bardzo istotne dla funkcji przemieszczania segrosomów w innych organizmach. Autorka sugeruje, że mechanizm działania ParA może być inny u promieniowców bo nie wykrywane jest oddziaływanie białek ParA-DNA. Jaki byłby to mechanizm?

Szczep KG23, czyli mutant *parA* ma pozostawione miejsca wiązania ParB w rejonie *oriC* i dodatkowa sekwencję *parS2* w genie struktury *parA* (*ami-parA*) wstawionym w inne miejsce chromosomu. Dodatkowe miejsca *parS* lub ich przeniesienie w odległe punkty chromosomu zaburzają bardzo silnie segregację chromosomów np. u *B. subtilis*. W doświadczeniach ze szczepem KG23 brakuje mi kontroli wzrostu i segregacji chromosomów w czasie hodowli na podłożu bez acetamidu tak, aby móc ocenić rolę takiej rearanżacji strukturalnej genomu.

Prowadzenie doświadczenia wzrostowego przy czasie podziału około 3 godzin, jest niewątpliwie bardzo żmudne. Jeśli jednak autorka pobierała próby co trzy godziny przez 48 godzin i analizowała ilość komórek zdolnych do tworzenia kolonii (c.f.u) to mogła wyznaczyć czas generacji a to byłby najlepszy parametr różnicujący szczepy mutantów i szczep typu dzikiego. Podawane w rozprawie wyniki porównujące wartość c.f.u. po 15 godzinach wzrostu nie mogą być traktowane jako punkt odniesienia do różnicowania szczepów ponieważ nie podano wartości c.f.u na starcie poszczególnych hodowli (różna zawartość komórek pozbawionych nukleoidu).

Dyskusja wyników przeprowadzona jest w kolejnych punktach, w których autorka odnosi się do kolejnych analizowanych zagadnień. Klarowność dyskusji jest jednak zakłócona dużymi skrótami myślowymi i miejscami nieuprawnionymi uogólnieniami np „zaburzenia lokalizacji segrosomów w szczepie pozbawionym ParA ...prowadzą do zmienionej przestrzennej organizacji pozostałej części nukleoidu” (str 153) czy „zmieniona, w wyniku eliminacji ParA, architektura segrosomów może prowadzić do nadmiernej inicjacji replikacji” (str 155).

Nie używałabym sformułowania „ParA jest odpowiedzialne za segregację chromosomów” raczej uczestniczy w procesie segregacji, mylne jest też sformułowanie „ParA bierze udział w wydłużaniu komórek” na podstawie uzyskanych wyników można powiedzieć, że to brak ParA wpływa na wydłużanie

komórek (str 158).

Wreszcie powoływanie się na dane doświadczalne własne ale „nie pokazane” nie powinno być używane w dyskusji jako argument na poparcie stawianych tez bo trudno ocenić ich „ wiarygodność”.

Na zakończenie chciałabym podkreślić, że praca mgr Katarzyny Gindy jest bardzo wartościowa merytorycznie, a większość moich uwag redakcyjnych wynika z dociekliwości recenzenta, pytania z chęci poznania opinii doktorantki. Na uwagę zasługuje fakt, że mgr Katarzyna Ginda jest współautorką publikacji w *Molecular Microbiology* i *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny **praca spełnia pod każdym względem wymogi stawiane pracom doktorskim**. Zwracam się więc do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Gindy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.