



poniedziałek, 27 sierpnia 2019

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Martyny Gongerowskiej-Jac pt.: "Współdziałanie topoizomeraz i białek wiążących DNA w kontrolowaniu topologii chromosomu, regulacji transkrypcji i odpowiedzi na stres u *Streptomyces*".**

Chromosom bakteryjny musi być upakowany przynajmniej 1000-krotnie aby mógł zmieścić się w niewielkich rozmiarów komórkach bakteryjnych. Biorąc pod uwagę fakt, że zazwyczaj nukleoid zajmuje tylko część komórki a w wielu intensywnie dzielących się komórkach występuje więcej niż jedna kopia chromosomu, rzeczywiste upakowanie materiału genetycznego jest jeszcze bardziej znaczące. Silna kondensacja materiału genetycznego nie może jednak doprowadzić do zaburzenia podstawowych dla komórki procesów takich jak replikacja, transkrypcja czy naprawy DNA, które wymagają przynajmniej lokalnej relaksacji DNA. Za właściwe upakowanie bakteryjnego DNA odpowiada superskręcenie podwójnej helisy regulowane przez topoizomerazy. W utrzymanie prawidłowej topologii nukleoidu zaangażowane są także białka NAP oraz SMC a ich współdziałanie czy współregulacja są procesami wciąż mało poznanymi. W tym kontekście w pełni uzasadnionym oraz niezwykle ciekawym wydaje się cel pracy postawiony przed Doktorantką zmierzający do identyfikacji białek współdziałających z topoizomerazą I w kontrolowaniu topologii chromosomu oraz regulowaniu transkrypcji genów zależnych od topologii DNA. Ze względu na ogromne doświadczenie oraz osiągnięcia promotora pracy Pani prof. dr hab. Dagmary Jakimowicz w badaniach bakterii z rodzaju *Streptomyces* oparcie badań na tym modelu badawczym również należy uznać za dobrze przemyślaną decyzję.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący topologii



chromosomu bakteryjnego, bakteryjnych topoizomeraz, regulacji ekspresji genów w tym genów których ekspresja jest regulowana stanem superskręcenia DNA. Ze względu na wybrany model badawczy obszerna część wstępu poświęcona została bakteriom z rodzaju *Streptomyces* w tym ich cyklu życiowym z uwzględnieniem topologii chromosomów, funkcji i regulacji poziomu topoizomerazy I czy roli topologii chromosomu w ekspresji genów u tych bakterii.

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 Doktorantki.

Opisując mechanizmy regulacji genów u bakterii Pani Martyna opisuje m.in. systemy dwuskładnikowe słusznie zauważając, że zazwyczaj składają się one z białka sensorowego będącego kinazą histydynową oraz regulatora odpowiedzi będącego czynnikiem transkrypcyjnym. **W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o uzupełnienie dotyczące innych mniej typowych systemów dwuskładnikowych, których białko regulatorowe nie jest czynnikiem transkrypcyjnym. Czy systemy takie identyfikowano u promieniowców, jaką funkcję może pełnić takie niekanoniczne białko odpowiedzi ?**

W rozdziale „Materiały i Metody” autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje bogactwo metodyczne pracy. Doktorantka z powodzeniem stosuje metody hodowlane w tym z zastosowaniem układów reporterowych, mikroskopowe, metody inżynierii genetycznej, metody skriningowe w postaci mutagenyzy transpozonojowej, ukierunkowaną rekombinację szczepów *Streptomyces*, czy też globalne analizy transkryptomyczne. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty mają właściwe układy kontrolne nie pozostawiające wątpliwości co do wartości uzyskanych wyników.

Część eksperymentalną autorka rozpoczęła od zastosowania losowej mutagenyzy transpozonojowej dla poszukiwania białek regulujących transkrypcję genu *topA* u *S. coelicolor*. W tym celu Doktorantka przygotowała system reporterowy pozwalający na badanie aktywności promotorów *topA* w czasie hodowli w zależności od tła genetycznego danego szczepu, przede wszystkim od stopnia superskręcenia DNA. Szczep reporterowy został poddany mutagenyzie



transpozonowej a uzyskana biblioteka w postaci 8 300 kolonii została poddana analizie pod kątem intensywności luminescencji w poszukiwaniu pozytywnych i negatywnych regulatorów transkrypcji *topA*. Jeden z 14 mutantów o obniżonej fluorescencji charakteryzował się obniżonym o 50% poziomem białka TopA i został szczegółowo przeanalizowany. W mutancie tym zidentyfikowano miejsce insercji w obrębie genu *sco4804* kodującego białko o nieznannej funkcji i podlegającego silnej indukcji w warunkach wysokiego superskręcenia DNA. Wykazano, że inaktywacja lub nadekspresja *sco4804* nie wpływa znacząco na superskręcenie chromosomu, lecz nadprodukcja SCO4804 aktywuje transkrypcję genu *topA*. Przeprowadzone badania pozwoliły więc zidentyfikować nowy czynnik regulatorowy zaangażowany w utrzymaniu homeostazy topologicznej u *Streptomyces*. Otwarte pozostaje pytanie czy wpływ SCO4804 na promotor *topA* jest bezpośredni czy też następuje za pośrednictwem innych białek regulatorowych. Czy obserwowany fenotyp w mutancie transpozonowym nie wynika przynajmniej częściowo z możliwego efektu polarnego tym bardziej, że geny sąsiadujące są również indukowane w warunkach wysokiego superskręcenia DNA a jeden z nich (*sco4803*) zawiera domenę interakcji z sigma54 (Sigma-54 interaction domain). **Prosilbym Doktorantkę o komentarz do powyższych przemyśleń. Ciekawy jestem również czy przy analizie mutantów z wyciszoną luminescencją identyfikowano kolonie fałszywie pozytywne wynikające np. z akumulacji mutacji w genach *lux*.**

W dalszej części pracy Doktorantka poszukiwała supresorów deplecji TopA. W tym przypadku również zastosowano mutagenезę transpozonową oraz wykorzystano zjawisko całkowitego zahamowania sporulacji w komórkach *S. coelicolor* z obniżonym poziomem topoizomerazy I. Do mutagenезy wykorzystano więc szczep niesporujący z obniżonym poziomem TopA poszukując mutantów które odzyskały zdolność do sporulacji. Spośród 8000 przebadanych klonów 14 posiadało pożądany fenotyp a 7 z nich zostało pozytywnie zweryfikowanych w analizach mikroskopowych. W uzyskanych mutantach identyfikowano miejsce integracji transpozonu oraz wykonano analizy wzrostu. Geny w obrębie których identyfikowano transpozon inaktywowano także w sposób ukierunkowany w szczepie wyjściowym potwierdzając w ten sposób zależność pomiędzy inaktywacją genu a uzyskanym fenotypem. Jeden z badanych mutantów posiadał integrację transpozonu w genie *sco4514* kodującym białko błonowe, mutant uzyskał zdolność do sporulacji, charakteryzował się przyspieszonym tempem wzrostu a usunięcie genu *sco4514* dawało podobny fenotyp.



Trudniejsze w interpretacji były wyniki uzyskane dla innych mutantów noszących transpozony w genie *thiC*, *sco7032*, *rhsA* czy też powyżej genów *parA* lub *lsr2*. Nawet w przypadku genów, których produkty mają udowodnioną rolę w topologii DNA czy segregacji chromosomów trudno było odtworzyć uzyskany efekt transpozycji w szczepie kontrolnym. W przypadku transpozycji powyżej genu *parA* nie zaobserwowano wpływu insercji na poziom transkrypcji genów operonu. Bardzo interesujące wyniki uzyskano dla mutantu noszącego podwójną transpozycję w genie *sco3390* oraz *sco2474*. Gen *sco3390* koduje kinazę histydynową, która prawdopodobnie wspólnie z produktem genu *sco3389* tworzy system dwuskładnikowy. Konstrukcja szeregu mutantów pozbawionych genów *sco3390/sco3389* jak i z ich nadprodukcją wykazała wpływ badanego systemu 2CS na wzrost oraz sporulację szczepu dzikiego oraz mutantu o obniżonym poziomie TopA. Wyniki otrzymane w globalnych analizach transkryptomicznych wskazują, że zidentyfikowany system dwuskładnikowy reguluje ekspresję genów regionu *shc* w sposób niezależny od superskręcenia DNA. Aktywacja transkrypcji genów tego regionu przyczynia się do zahamowania wzrostu oraz opóźnienia sporulacji. W tym kontekście interesujące są również analizy innego mutantu transpozonoowego o odzyskanej zdolności do sporulacji noszącego insercję w genie *rhsA* znajdującym się również w regionie *shc*. Insercja transpozonu a także kasety hygromycynowej w tym loci powodowały obniżenie poziomu transkrypcji genów regionu *shc*. Regulator odpowiedzi w systemach dwukomponentowych ulega aktywacji poprzez fosforylację. Proces fosforylacji jest indukowany przez określony sygnał środowiska. Dlatego też nadprodukcja białka regulatorowego i badanie efektu tej nadprodukcji na poziomie transkryptomicznym bez wiedzy na temat jego fosforylacji może mieć ograniczone zastosowanie. **Czy planowane jest uzupełnienie przeprowadzonych, niezwykle bogatych analiz transkryptomicznych o układ kontrolny gdzie białko regulatorowe nie mogłoby ulegać fosforylacji ? Czy Doktorantka, lub następcy, planują zidentyfikować sekwencje konsensusową dla wiązania badanego białka regulatorowego w promotorach genów o zmienionej ekspresji ? Czy podjęte zostały próby badania oddziaływań pomiędzy badanym białkiem regulatorowym a wybranymi promotorami genów (np. własnym czy 2CS z regionu *shc*) ?**

Dyskusja pracy została napisana profesjonalnie, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Szczególnie pomocne dla czytelnika są zamieszczone w tej części pracy schematy i ryciny



obrazujące omawiane zagadnienia. Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę i zamieszczone w rozdziale Wyniki (przy podsumowaniu poszczególnych rozdziałów) oraz w Podsumowaniu pracy mają silne podstawy w prezentowanych wynikach i można uznać je jako w pełni uprawnione. Zabrakło mi może wydzielenia Wniosków jako syntetycznego podsumowania najważniejszych osiągnięć Doktorantki.

### Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Martyny Gongerowskiej-Jac 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 odpowiada warunkom ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (zgodnie z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 roku poz. 261 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim) a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

Wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na bogactwo metodyczne pracy, ogrom uzyskanych wyników, doskonałość naukową przeprowadzonych eksperymentów oraz świetnie przygotowaną dokumentację badań wnoszę do Wysokiej Rady o nagrodzenie Doktorantki przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek