



25. 06. 2021 r.

Dr hab. Anna Brzostek

Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

Ocena pracy doktorskiej mgr Marty Kołodziej pt. „Rola białka Lsr2 w organizacji chromosomu i regulacji ekspresji genów *Mycobacterium smegmatis*”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Zespół kierowany przez Panią prof. dr hab. J. Zakrzewską – Czerwińską jest autorytetem światowej rangi w dziedzinie prac badawczych dotyczących replikacji i segregacji materiału genetycznego bakterii. Jednocześnie, należy podkreślić że Doktorantka przystępując do realizacji celów pracy doktorskiej miała do dyspozycji bardzo dobry warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową i co zasługuje na podkreślenie wiedzę i doświadczenie naukowe promotora.

Pracę doktorską Pani mgr Marty Kołodziej stanowi zbiór dwóch prac eksperymentalnych, spójnych tematycznie, opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku cytowalności IF ok. 7.7 oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w języku polskim. We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a załączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do Jej kluczowej roli w realizacji opisywanych badań.

Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest białko Lsr2, należące do grupy białek związanych z nukleoidem (NAP) i jego udział w organizacji chromosomu podczas cyklu komórkowego *M. smegmatis*. Ten przedstawiciel szybko rosnących mykobakterii, stanowi organizm modelowy dla badań prątków gruźlicy. Doniesienia literaturowe wskazują, że Lsr2 jest białkiem niezbędnym do przeżywania dla *M. tuberculosis* w przeciwieństwie do *M. smegmatis*. Udowodniono także jego udział w nabywaniu oporności na antybiotyki i kontroli ekspresji



genów pozyskiwanych na drodze transferu horyzontalnego u *M. tuberculosis*. Ponadto autorzy wcześniej opublikowanych prac wykazali wiązanie białka Lsr2 z *M. tuberculosis* do sekwencji bogatych w pary AT i zdolność łączenia odległych segmentów DNA sugerując jego rolę w organizacji i zagęszczeniu nukleoidu.

Z uwagi na odmienne środowisko bytowania prątka gruźlicy i *M. smegmatis* wyjaśnienie funkcji białka Lsr2 u tego saprofitycznego gatunku wydaje się być ciekawym zagadnieniem podjętym przez Doktorantkę. W tym celu, w pierwszym etapie badań skonstruowano mutantą *M. smegmatis* z delecją w genie *lsr2* wykazując, że komórki pozbawione Lsr2 są krótsze, szersze i sztywniejsze niż komórki szczepu dzikiego. A obserwowane różnice w morfologii komórek Doktorantka wiąże ze zmianami w profilu transkrypcji genów. **W tym miejscu chciałabym poprosić Panią mgr Martę Kołodziej o doprecyzowanie informacji i wskazanie kandydatów (genów), które mogą mieć związek z obserwowanymi zmianami morfologii komórek *M. smegmatis*?**

Ponadto Doktorantka wykazała również rolę białka Lsr2 jako czynnika transkrypcyjnego- głównie represora, kontrolującego ekspresję genów bezpośrednio poprzez wiązanie regionów promotorowych wykorzystując w tym celu technikę immunoprecypitacji chromatyny połączoną z globalnym sekwencjonowaniem genomu (ChIP-seq). Dodatkowo przeprowadzone analizy sekwencjonowania transkryptów RNA (RNA-seq) pozwoliły na identyfikację genu MSMEG_4727, kodującego syntazę poliketydów zaangażowaną w syntezę lipooligosacharydów (LOS). Badania przeprowadzone przez Panią mgr M. Kołodziej dowodzą, że szczep *M. smegmatis* pozbawiony genu *lsr2* wytwarza więcej lipooligosacharydów co ma wpływ na zmianę składu otoczki komórkowej i jej właściwości fizyczne min. na przepuszczalność dla antybiotyków. **Czy zastosowanie znakowanych izotopowo antybiotyków (np. rifampicyny) nie pozwoliłoby bezpośrednio odpowiedzieć na pytania dotyczące różnic w przepuszczalności osłon komórkowych przez badane szczepy *Mycobacterium* i przybliżyć mechanizm lekowrażliwości?**

W pracy eksperymentalnej opublikowanej w *Scientific Reports* (Kołodziej M. i wsp., 2021) Doktorantka opisuje bardzo dobrze zaplanowane badania lokalizacji białka Lsr2 w trakcie cyklu komórkowego *M. smegmatis*, jego wpływ na proces replikacji chromosomu, a także rolę N-końcowej domeny badanego białka w oligomeryzacji wykorzystując nowoczesne techniki mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym, a także mikroskopii wysokorozdzielczej oraz rekombinowane, reporterowe szczepy bakteryjne umożliwiające



ekspresję analizowanego białka w fuzji z różnymi białkami fluorescencyjnymi i białkami markerowymi takimi jak: HupB, DnaN czy ParB.

Natomiast druga praca eksperymentalna opublikowana w *mSphere* (Kołodziej M. i wsp., 2021) jest kontynuacją i poszerzeniem badań Doktorantki, w której Autorzy skupili uwagę na regulacji ekspresji genów przez białko Lsr2 oraz podjęli się określenia roli białek Lsr2 i jego paraloga MSMEG_1060 (dotychczas bardzo słabo scharakteryzowanego) w adaptacji komórek *M. smegmatis* do niekorzystnych warunków środowiskowych (ograniczony dostęp tlenu). Autorzy przeprowadzając szereg przemyślanych eksperymentów, posługując się technikami biologii molekularnej i nowoczesnej mikroskopii, dostarczyli cennych informacji na temat nowego białka MSMEG_1060 przypisując mu funkcje protekcyjną przeciwko antybiotykowi takim jak kwas nalidyksynowy czy rifampicyna. **Czy antybiotyki z innych grup (nie tylko związane z blokowaniem replikacji DNA) nie powinny zostać włączone do testów przeżywalności mutantów Lsr2 i MSMEG_1060 aby zweryfikować przeprowadzone przez Panią obserwacje?**

Trzecia załączona praca, to praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie Postępy Biochemii, która przedstawia obecny stan wiedzy na temat organizacji chromosomu bakteryjnego oraz wyjaśnia fizyczne i molekularne czynniki wpływające na organizację chromatyny w komórce, z wykorzystaniem wysokoprzepustowych metod analizy DNA i zaawansowanych technik obrazowania (tj. mikroskopia wysokorozdzielcza). Praca ta z pewnością będzie mogła zostać wykorzystana jako cenne źródło informacji o organizacji chromosomu bakteryjnego.

Załączone publikacje stanowiące podstawę recenzowanej pracy doktorskiej zostały poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz krótkim wprowadzeniem opisującym cel pracy i najważniejsze osiągnięcia prezentowanych prac eksperymentalnych wraz z odpowiednio zacytowaną literaturę naukową. Uważam, że w opisanym Celu pracy powinna zostać zamieszczona informacja o jakim stresie komórki jest mowa? Ponadto w angielskiej wersji streszczenia Doktorantka używa zwrotów "I demonstrated" lub „my results” a bardziej poprawnie należałoby stosować formę bezosobową lub pisać w liczbie mnogiej. Pomimo, krótkiego podsumowania wyników przez Doktorantkę warto byłoby zamieścić dodatkowo rozdział Wnioski i wypunktować najważniejsze osiągnięcia z przeprowadzonych badań.

Pragnę podkreślić, że ogromna wiedza i doświadczenie zespołu w badaniach nad organizacją chromosomu bakteryjnego pozwoliły na właściwą interpretację wyników prac eksperymentalnych, a bogata dokumentacja w postaci zdjęć, wykresów, rycin i filmów, jak



również właściwie wyciągnięte wnioski z otrzymanych wyników i prawidłowo przeprowadzona dyskusja świadczą o dużej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań.

Na zakończenie chciałabym poprosić **Doktorantkę o podzielenie się wiedzą na poniższe kwestie:**

- Czy białko Lsr2 *M. tuberculosis* z uwagi na fakt, że jest białkiem niezbędnym do przeżywania prątków, mogłoby być tarczą (celem) dla leków przeciwprątkowych ?
- Czy możliwe jest na tym etapie badań sugerowanie białek partnerskich dla Lsr2 i MSMEG_1060, a tym samym wskazanie szlaków komórkowych, w które białka te byłyby zaangażowane?
- Czy planuje Pani podjąć dalsze badania białka MSMEG_1060 w celu bardziej dogłębnego poznania jego funkcji u *M. smegmatis*? Jeśli tak to czy mogłaby Pani zaproponować metody, które byłyby niezbędne dla zrozumienia roli tego białka? Czy warto byłoby przeprowadzić analizy przeżywalności mutantów z delecją w genach Lsr2 i MSMEG_1060 w obecności innych czynników stresowych niż opisane w pracy doktorskiej np. woda utleniona czy mitomycyna C?

Podsumowanie:

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Marty Kołodziej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Marty Kołodziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na ciekawą tematykę badań i uzyskanie niezwykle ważnych wyników oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani mgr Marty Kołodziej przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Anne Brzostek