



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ
BIOLOGII

UNIWERSYTET GDAŃSKI

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 31.08.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Martyny Gongerowskiej-Jac

„Współdziałanie topoizomeraz i białek wiążących DNA w kontrolowaniu topologii chromosomu, regulacji transkrypcji i odpowiedzi na stres u *Streptomyces*”

Znaczenie topologii DNA jako czynnika regulacyjnego dla procesów związanych z powielaniem i przekazywaniem informacji genetycznej, jak również w kontroli ekspresji genów jest mało poznanym i stosunkowo nowym obszarem nauk o życiu. Poza mechanicznym upakowaniem materiału genetycznego w komórce, konformacja DNA pełni bardzo ważną rolę zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych w udostępnianiu odpowiednich rejonów DNA dla procesów transkrypcji i replikacji. Jest to proces dynamiczny, kontrolowany przez białka wiążące i kondensujące DNA jak i te, które wprowadzają i usuwają zmiany w skręceniu DNA powodowane przez np. przesuwanie się polimerazy DNA czy RNA. Uznanie topologii DNA za pełnoprawny element regulacyjny w m.in. ekspresji genów otworzyło możliwości dla badań tych procesów na modelu bakteryjnym. Mikroorganizmy charakteryzują się dużą zdolnością do szybkiego i precyzyjnego reagowania na zmiany w środowisku życia, tak by

optymalnie przystosować się i zapewnić możliwości przeżycia i wzrostu. Szczególnie u bakterii bytujących w zmiennych środowiskach można odnaleźć wiele złożonych mechanizmów przystosowawczych. Do takich bakterii należą te z rodzaju *Streptomyces*, dlatego stanowią one dogodny model badawczy, także dzięki dobrze poznanemu i nietypowemu cyklowi rozwojowemu obejmującemu etapy takie jak grzybnia wegetatywna, grzybnia powietrzna oraz sporulacja. Przedstawicie tego rodzaju, *S. coelicolor* był przedmiotem badań Pani mgr Martynty Gongerowskiej-Jac. Rozprawa została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką Pani dr hab. Dagmary Jakimowicz. Zespół naukowy Pani Profesor Jakimowicz specjalizuje się w badaniach procesów życiowych i rozwojowych u promieniowców, w związku z czym w swojej pracy Doktorantka mogła skorzystać z szerokiego zakresu metodologii, wiedzy i doświadczenia Opiekuna i pracowników zespołu.

Tematyką pracy Pani mgr Gongerowskiej-Jac była identyfikacja i charakterystyka czynników komórkowych oddziałujących z topoizomerazą I w regulacji topologii DNA i pośrednio uczestniczących w kontroli ekspresji genów. Białko TopA jest jedyną topoizomerazą tego typu u *S. coelicolor*, dlatego jej znaczenie w regulacji procesów komórkowych jest bardzo duże. Jednakże, niewiele wiadomo o białkach wpływających na ekspresję genu *topA* czy współdziałających z białkiem TopA w regulacji skręcenia DNA. Dlatego istotne było podjęcie przez Doktorantkę tego tematu, co miało na celu wzbogacenie wiedzy podstawowej o funkcjonowaniu bakterii z ważnego, zarówno jako model badawczy jak i w biotechnologii, rodzaju *Streptomyces*. W tym celu wykorzystany został bogaty zestaw metod mikrobiologicznych, inżynierii genetycznej, jak również analiz molekularnych i wysokoprzepustowych. Szczególnie zwraca uwagę staranność w doborze plazmidów i szczepów oraz bardzo dokładna weryfikacja uzyskiwanych konstruktyw. Dzięki temu uzyskane wyniki charakteryzują się wysokim poziomem wiarygodności.

Największą naukową wartością pracy stanowi podjęcie systematycznych i dobrze zaplanowanych poszukiwań – na poziomie całego genomu – czynników oddziałujących wspólnie z TopA na topologię DNA. Precyzyjnie dobrane szczepy umożliwiające kontrolowane zmiany poziomu TopA, zastosowane układy genów reporterowych jak i przeanalizowane biblioteki mutantów transpozonowych pozwoliły na zidentyfikowanie genów związanych z aktywnością promotora *topA* jak i tych supremujących efekty niskiego poziomu TopA w komórce. Co ciekawe,

zidentyfikowana została tylko jedna mutacja charakteryzująca się istotnym wpływem na transkrypcję z promotora *topA*, w genie kodującym białko o nieznannej i jedynie hipotetycznej funkcji. Do badań supresji niedoboru TopA zastosowano jako marker zdolność bakterii do sporulacji, zależną od topologii DNA oraz tempo wzrostu bakterii. Spośród uzyskanych mutantów zbadanych dokładniej zostało 7 szczepów. Identyfikacja miejsca insercji transpozonów pozwoliła na identyfikację potencjalnych czynników wpływających na superzwinięcie DNA. Mechanizm działania kilku z mutacji nie jest do końca wyjaśniony, szczególnie iż nieznaną jest funkcja genów, w których pojawiły się mutacje. Interesująco, spośród genów o znanych funkcjach, zidentyfikowano jako niosące mutacje supresorowe geny ParAB, których produkty biorą udział w segregacji chromosomów, białko wiążące się z nukleoidem, Lsr2 oraz system dwuskładnikowy, regulujący ekspresję genów z rejonu wrażliwego na stan superzwinięcia DNA. Mechanizmy oddziaływania produktów tych genów z TopA (pośrednio lub bezpośrednio) są póki co niejasne. Jednakże uzyskane wyniki wskazują na skomplikowany i wieloczynnikowy sposób regulacji homeostazy topologii DNA w komórce, celem dopasowania jej do zmiennych warunków środowiska. Podkreślić należy ogrom pracy włożony w przygotowanie kolekcji szczepów, bibliotek mutantów (liczonych w tysiącach) i przeprowadzonych analiz. Rezultaty pracy zostały udokumentowane bardzo dokładnie, a każdy etap badań podlegał szczegółowej analizie i weryfikacji.

Konstrukcja pracy jest prawidłowa, z podziałem na rozdziały typowe dla tego rodzaju opracowań. I tak, Wstęp jasno i przejrzysto wprowadza w tematykę znaczenia topologii DNA, białek kontrolujących konformację DNA jak również procesów rozwojowych *Streptomyces*. Przetawione informacje opierają się na szerokim wyborze aktualnych publikacji i dobrane są tak, by podać niezbędną dla zrozumienia tematyki wiedzę, bez niepotrzebnego nadmiaru wątków. Rozdział Materiały i Metody jest bardzo obszerny, obejmuje bowiem szczegółowe opisy nie tylko podstawowych metod, ale i opis konstrukcji plazmidów i szczepów. Schematy, ryciny i tabele pomagają w usystematyzowaniu podanych informacji oraz w odnoszeniu ich do wyników prezentowanych w kolejnym rozdziale. Ta część rozprawy (Wyniki) jest podzielona na podrozdziały odpowiadające pytaniom naukowym stawianym w pracy oraz różnym podejściom doświadczalnym. Opis wyników jest jasny i dokładny, pozwalający na podążanie za tokiem pracy Doktorantki. Rozdział Dyskusja jest niewątpliwie mocną stroną pracy. Uzyskane, często niejednoznaczne wyniki, zostały przedstawione w świetle dotychczasowej wiedzy a w przypadku

każdego z analizowanych mutantów Doktorantka postarała się o przedstawienie hipotezy oraz potencjalnych schematów i mechanizmów działania. Świadczy to o szerokiej wiedzy i dojrzałości naukowej Pani Gongerowskiej-Jac. Lista publikacji podana w Bibliografii jest odpowiednio dobrana do zakresu i tematyki pracy.

Godna podkreślenia jest dbałość o poprawny i jasny język w rozprawie. Zawiera ona bardzo niewielką liczbę błędów redakcyjnych i językowych (wśród nich zwraca uwagę jeden błąd ortograficzny str. 192, oraz nietypowe wyrażenia jak „komórki ekspresjonujące geny” czy „sekwencje konserwatywne” czy błędny zapis symbolu sigma), jednakże ogólnie praca napisana jest z dużą dbałością o gramatykę i styl oraz język naukowy.

W związku z zamieszczonym w rozprawie wynikami i ich interpretacjami chciałam poprosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących uwag i pytań:

1. W rozprawach naukowych a szczególnie doktorskich, poza celem badań, którym jest tu poszukiwanie białek współdziałających z TopA, istotne jest sformułowanie hipotez naukowych, które następnie są weryfikowane podczas pracy. Poprosiłabym zatem, aby Doktorantka podczas obrony przedstawiła główne hipotezy swoich badań.
2. Czy dla zbadania możliwych bezpośrednich oddziaływań między TopA a czynnikami komórkowymi można by zastosować metodę pull-down i następnie identyfikację związanych białek?
3. W kontroli procesów komórkowych poprzez topologię DNA mogą uczestniczyć takie globalne procesy jak odpowiedź ścisła (np. jak pokazano w ostatnio opublikowanej pracy- Kraemer et al., mBio, 2019). Czy także u *Streptomyces alarmon* odpowiedzi ścisłej, ppGpp, może oddziaływać na stan superzwinięcia DNA i w ten sposób wpływać na regulację replikacji DNA?
4. Poszukiwania genów wpływających na procesy związane z działaniem TopA drogą mutagenezy transpozonowej mają ograniczenia w postaci niemożności identyfikacji czynników, które są niezbędne do życia komórki. Czy można by w takim razie zastosować metodę poszukiwań mutacji supresorowych dla defektów wzrostu i rozwoju szczepów z obniżonym poziomem TopA? Umożliwiłoby to zidentyfikowanie mutacji nie inaktywujących całkowicie genów, ale np. mutacji punktowych.

5. W pracy zidentyfikowano szereg genów mających wpływ na topologię DNA zależną od białka TopA. Jednakże mechanizm tego działania w wielu przypadkach pozostaje niejasny. Które z tych genów wydają się najciekawsze i najbardziej obiecujące dla dalszych badań?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu, stwierdzam, że oceniana praca stanowi ważne osiągnięcie naukowe i wzbogaca wiedzę o procesach życiowych bakterii z rodzaju *Streptomyces*, w mało poznanej do tej pory tematyce topologii DNA i wpływu białek regulujących topologię na ekspresję genów i rozwój bakterii. Wysoka wartość naukowa pracy pozwala na stwierdzenie, iż rozprawa odpowiada warunkom i wymogom zawartym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Przedstawione w rozprawie osiągnięcia naukowe uzasadniają nadanie Doktorantce stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Dlatego, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Martynty Gongerowskiej-Jac do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz