



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ
BIOLOGII

UNIWERSYTET GDAŃSKI

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Biologii Molekularnej
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 19.11.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Patrycji Skut

„Wpływ poziomu topoiizomerazy I na cykl komórkowy *Mycobacterium smegmatis*”

Badania nad bakteriami chorobotwórczymi prowadzone są w miarę możliwości na niepatogennych szczepach modelowych, dla zapewnienia badaczom bezpieczeństwa i umożliwienia prowadzenia doświadczeń w laboratoriach o zwykłym poziomie zabezpieczeń. Taka bakterią jest *Mycobacterium smegmatis*, modelowy gatunek dla badań nad *Mycobacterium tuberculosis*, będącej czynnikiem etiologicznym dla gruźlicy. Zakażenia prątkiem gruźlicy stanowią nadal zagrożenie dla zdrowia publicznego, szczególnie z powodu coraz częstszego pojawiania się szczepów opornych na większość znanych antybiotyków. Dlatego poznanie mechanizmów ważnych procesów życiowych prątków jest istotną podstawą dla przybliżenia możliwości zastosowania nowych leków w terapii kierowanej przeciwko specyficznym, niezbędnym dla przeżycia bakterii, enzymom i mechanizmom komórkowym. *M. smegmatis* poza dużym podobieństwem genetycznym do *M. tuberculosis* oraz zbliżoną budową ściany komórkowej, charakteryzuje się szybkim wzrostem, co znacząco ułatwia prace badawcze. Także, znana jest pełna sekwencja genomowa modelowego laboratoryjnego szczepu *M. smegmatis* mc². W ważny nurt badań nad wykorzystaniem tej bakterii do poszukiwań nowych celów terapeutycznych pośród białek zaangażowanych w istotne życiowe procesy komórkowe wpisuje się rozprawa doktorska Pani Patrycji Skut. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie

Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Dagmary Jakimowicz. W zakładzie tym od lat prowadzone są - z wielkim sukcesem - badania nad mechanizmami replikacji i kluczowymi etapami cyklu komórkowego bakterii na modelu promieniowców z rodzajów *Streptomyces* i *Mycobacterium*. Praca doktorska Pani Skut w swoich walorach naukowych i poznawczych dorównuje najlepszym pracom tego zespołu, prezentując szeroki zakres bardzo starannie opisanych wyników badań nad topoizomerazą I *M. smegmatis*.

Poznanie mechanizmów regulacji replikacji i podziałów komórkowych jest podstawową wiedzą dla zrozumienia procesów zachodzących w organizmach żywych. Poza bardzo ważnym wzbogaceniem wiedzy na poziomie podstawowym, badania takie dają informacje o możliwych celach działania leków. W dobie wzrastającej oporności na antybiotyki i zmniejszającej się możliwości syntezy nowych substancji bakteriobójczych, poszukiwania nowych terapii dla zakażeń bakteryjnych jest bardzo ważną dziedziną badań naukowych. Preferencyjnym celem działania nowych substancji antibakteryjnych są enzymy nie tylko kluczowe dla przeżycia bakterii ale także preferencyjnie specyficzne dla bakterii docelowej, a nieszkodliwe dla organizmu ludzkiego. Proces replikacji DNA i podziału komórki jest ciekawym celem działania potencjalnych terapeutyków, z uwagi na jego kluczowe znaczenie dla przeżycia i propagacji bakterii. Do zrealizowania takiego zamierzenia niezbędne jest dokładne poznanie mechanizmów działania, roli oraz skutków braku określone białka. Celem pracy doktorskiej Pani Patrycji Skut było zbadanie wpływu zróżnicowanego poziomu topoizomerazy *M. smegmatis* na cykl komórkowy tej bakterii. Rolą topoizomeraz jest utrzymywanie odpowiedniego superskręcenia helisy DNA. Topologia DNA jest bardzo istotnym czynnikiem regulującym procesy ekspresji genów, replikacji, rekombinacji i segregacji materiału genetycznego do komórek potomnych, w związku z tym wiele bakterii ma kilka różnych wyspecjalizowanych enzymów odpowiedzialnych za zmiany superskręcenia towarzyszące bądź wymagane dla różnych procesów. W niniejszej rozprawie Doktorantka scharakteryzowała w szeregu logicznie przedstawionych etapów pracy odpowiedź komórki bakterii na niedobór topoizomerazy I. Obejmują one próby wyeliminowania aktywnego białka TopA, badania wpływu obniżonego poziomu topoizomerazy na tempo wzrostu bakterii, charakterystykę procesu replikacji i segregacji chromosomów przy deplecji TopA oraz analizę roli C-końcowej domeny tego białka.

Za główne osiągnięcia pracy doktorskiej Pani Patrycji Skut uważam:

- wykazanie, iż delecja genu *topA* jest letalna dla komórki *M. smegmatis*,
- zastosowanie dobrze dobranej konstrukcji umożliwiającej kontrolowane modyfikowanie poziomu topoizomerazy w komórce,
- określenie minimalnego poziomu białka TopA niezbędnego dla prawidłowego wzrostu bakterii,
- wykazanie, iż skutki niedoboru TopA ujawniają się bardziej znacząco w warunkach stresu temperaturowego,
- scharakteryzowanie skutków niedoboru topoizomerazy w postaci zaburzeń replikacji, segregacji chromosomu i podziału komórek,
- określenie roli C-końcowej domeny TopA w aktywności białka.

Wnioski przedstawione w pracy zostały osiągnięte dzięki zastosowaniu szerokiego zakresu metod molekularnych, takich jak analiza ekspresji genów metodą ilościowego PCR, analiza poziomu białka metodą Western, klonowania z użyciem złożonych wektorów i konstruktorów plazmidowych oraz nowoczesnych technik mikroskopowych, wykorzystujących obserwacje zmian w rozmieszczeniu replisomu i segresomu, a także podziału komórki w czasie rzeczywistym, przy zastosowaniu mikroskopii mikroprzepływowej z użyciem znaczników fluorescencyjnych. Szczególnie należy podkreślić znaczenie tej ostatniej metody, wymagającej konstrukcji precyzyjnie dobranych i dokładnie sprawdzonych szczepów zawierających złożone systemy ekspresyjne, umożliwiające zarówno regulowanie poziomu TopA w układzie delecji chromosomalnej kopii genu jak i uzyskanie białek fuzyjnych, DnaA i ParB.

Mam kilka uwag i pytań odnoszących się do części eksperymentalnej pracy:

1. Czy w sytuacji letalności mutantów pozbawionych funkcjonalnego TopA oraz zaburzeń wzrostu obserwowanych przy obniżeniu poziomu tego białka możliwe byłoby uzyskanie potencjalnych supresorów w genie kodującym gyrazę? Czy znane są w ogóle mutacje suprymujące niedobór topoizomerazy u *M. smegmatis*?

2. Obniżenie poziomu TopA do około 58% nie skutkowało znacznymi zmianami tempa wzrostu bakterii, wpływ na podział komórki był także dość niewielki. W układzie, gdzie poziom TopA obniżony został przez zastosowanie systemu revTetR do 20%, obserwowano znaczniejsze obniżenie tempa wzrostu bakterii, niż w przypadku zastosowania typowego systemu TetR. Jednakże dla analiz mikroskopowych zastosowano obniżenie poziomu topoizomerazy w zmiennym zakresie 30-60%, a zatem najwyższy poziom był podobny do tego z poprzedniego eksperymentu. Do jakiego poziomu TopA można więc odnosić wyniki odnoszące się do położenia replisomu i segresomu i jak porównywać je z tymi otrzymanymi w doświadczeniach z udziałem konstruktów TetR?

3. Jaka jest stabilność TopA w komórce?

4. Czy TopA z innych gatunków z rodzaju *Mycobacterium*, albo z bardziej odległych ewolucyjnie rodzajów bakterii może być funkcjonalne u *M. smegmatis*?

5. Czy stres spowodowany zmianą w topologii DNA w szczepach ze zmienionym poziomem TopA może powodować indukcję syntezy alarmonu stresu, ppGpp u *M. smegmatis*?

6. Jaka jest geneza nazwy szczepu *M. smegmatis*, mc²?

Obszerna, prawie 240 stronicowa rozprawa Pani Patrycji Skut ma układ poprawny dla tego typu opracowań. Streszczenie w języku polskim i angielskim zwięźle i zrozumiale podsumowuje przedstawiane przez Doktorantkę wyniki pracy. Wstęp (27 stron) wprowadza w interesujący sposób w zagadnienie organizacji chromosomów bakteryjnych i funkcji białek wpływających na topologię DNA, w zrozumieniu tej tematyki pomagają liczne ryciny i schematy. Wstęp podaje także informacje na temat *Mycobacterium* i jego znaczenia oraz stan dotychczasowej wiedzy na temat topoizomeraz prątków. W celu pracy ujęte jest także uzasadnienie podjęcia badań nad topoizomerazą *M. smegmatis*, sam cel jest przedstawiony jasno i zrozumiale. Rozdział Materiały i metody (56 stron) zawierają przejrzysty opis szczepów, konstruktów i plazmidów używanych w pracy, jak również staranny opis metod. W tym rozdziale dokładnie opisane zostały także procesy konstrukcji i klonowań szczepów, dla lepszego zrozumienia zaopatrzone w czytelne schematy. Rozdział Wyniki (80 stron) zawiera opis poszczególnych etapów realizacji celu projektu, udokumentowany dobrze zaplanowanymi, przeprowadzonymi i przeanalizowanymi doświadczeniami i zilustrowany świetnymi zdjęciami mikroskopowymi. Podkreślić należy staranne opracowanie wyników i przedstawienie ich w przejrzysty sposób, co jest szczególnie ważne przy tak obszernej tematyce i ilości uzyskanych

danych. Docenić trzeba także ogrom pracy włożony w skonstruowanie układów doświadczalnych i wykonanie niełatwych eksperymentów. Wyraźnie jest widoczne, iż Doktorantka swobodnie posługuje się szerokim warszatem nowoczesnych metod, potrafi je dobrze dobrać i opisać. W rozdziale Dyskusja Autorka dojrzałe przedstawia osiągnięcia swojej pracy na tle dotychczasowej wiedzy, a co ważne, potrafi także ustosunkować się do wyników niezgodnych z publikowanymi przez naukowców z innych ośrodków. Cytowany obszerny zbiór literatury pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka jest zaznajomiona z szerokim zakresem wiedzy w dziedzinie mikrobiologii, biochemii i biologii molekularnej.

Rozprawa napisana jest ładnym, poprawnym i zrozumiałym językiem naukowym. Z obowiązku recenzenta zauważę obecność błędów literowych i interpunkcyjnych, jednakże są one nieliczne, na podkreślenie zasługuje natomiast fakt uniknięcia typowego dla opracowań w języku polskim wyrażenia żargonowych. Zastanawia jednak sposób cytowania prac źródłowych, gdzie użyto angielskiego "and" pomiędzy nazwiskami autorów, oraz zastosowano kolejność alfabetyczną a nie, jak się ogólnie przyjęło, chronologiczną.

Dla oceny dorobku naukowego Doktorantki należy zauważyć, że Pani Patrycja Skut jest współautorem trzech publikacji naukowych: dwóch prac doświadczalnych i jednej przeglądowej. W oparciu o wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej, jest obecnie przygotowywany manuskrypt publikacji, który bez wątpienia będzie interesującą pozycją dla stanu wiedzy o procesach życiowych *Mycobacterium*.

Podsumowując, uważam, iż poziom naukowy rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Skut jasno pokazuje, iż Doktorantka dobrze skorzystała z możliwości, jakie dała jej nauka i realizacja pracy doktorskiej w zespole Pani dr hab. Dagmary Jakimowicz. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim, wyszczególnione w Ustawie z dnia 18.03.2011 o stopniach naukowych i tytułach naukowych, zaś dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Patrycji Skut do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na podjęcie i zrealizowanie, za pomocą starannie dobranej warsztatu badawczego i nowoczesnych metod, istotnej i niełatwej tematyki oraz na wysokie walory poznawcze pracy, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

A. Szolenska - Peten