



wtorek, 29 grudnia 2015

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Donczew „Analiza dynamiki wzrostu, różnicowania i segregacji chromosomów u *Streptomyces venezuelae*”.

Nie wszyscy Doktoranci stają przed szansą realizacji swojej pracy doktorskiej w uznanych zespołach badawczych od lat regularnie publikujących swoje prace w dobrych czasopismach naukowych. Do zespołów takich niewątpliwie należy zaliczyć macierzystą jednostkę Doktorantki, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz grupę kierowaną przez dr hab. Dagmarę Jakimowicz oraz prof. dr hab. Jolantę Zakrzewską-Czerwińską. Ze względu na dostęp do bogatego, wyszukanego warsztatu badawczego, niezbędnej aparatury naukowej i co najważniejsze do wiedzy i doświadczenia naukowego promotora, stawiane przed Doktorantką oczekiwania są z pewnością również bardzo wysokie. Bardzo mi miło, jako recenzentowi, po lekturze pracy doktorskiej stwierdzić, że te wysokie oczekiwania zostały w pełni spełnione.

Zespół badawczy, w którym Doktorantka realizowała swój projekt, jest autorem szeregu świetnie opublikowanych prac opisujących procesy segregacji chromosomów oraz tworzenia przegród poprzecznych w trakcie sporulacji wykonanych na modelowym organizmie *S. coelicolor*. Ze względu na pewne ograniczenia metodyczne związane z wykorzystaniem tego modelowego organizmu, przed Doktorantką postawiono ambitne zadanie, wprowadzenia do badań nowego szczepu z rodzaju *Streptomyces*, niebadanego wcześniej pod tym kątem, *S. venezuelae*. Celem badań, było zastosowanie techniki filmów poklatkowych dla zbadania wpływu białek segregacyjnych i organizacji chromosomu na dynamikę wzrostu i różnicowania strzępek badanego szczepu.



Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący organizacji chromosomu bakteryjnego, replikacji i segregacji chromosomu oraz cytokinezy bakterii. Następnie Doktorantka zapoznaje czytelnika ze swoim modelem badawczym charakteryzując bakterie z rodzaju *Streptomyces* ze szczególnym uwzględnieniem złożonego cyklu życiowego tych bakterii. Ostatni podrozdział Wstępu, poświęcony *S. venezuelae* jest jednocześnie uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej. 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 autorki. Jedynym, zbyt daleko posuniętym uogólnieniem było umieszczone na str. 21 stwierdzenie Autorki, że „*białka NAP, ..., pełnią w komórce bakteryjnej funkcje podobne do histonów obecnych w komórkach eukariotycznych*”. **Prosiłbym Doktorantkę o bardzo syntetyczne przedstawienie funkcjonalnych podobieństw i różnic pomiędzy eukariotycznymi histonami i bakteryjnymi białkami histonopodobnymi.**

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 różnorodność zastosowanych w pracy technik molekularnych co pozwala przypuszczać, że Doktorantka w czasie realizacji pracy zdobyła szerokie doświadczenie nie tylko w metodach obrazowania komórek ale również w pracy laboratoryjnej z kwasami nukleinowymi oraz białkami. Bardzo ciekawą metodą wykorzystaną przez Autorkę jest międzyrodzajowa koniugacja kosmidu z komórek *E. coli* do spor *S. venezuelae* (str. 81). **W tym miejscu chciałbym dopytać, czy transfer DNA zachodzi faktycznie do spor, czy też do kielkujących z nich strzępek? Czy formy przetrwalne w postaci spor mają zdolność pobierania obcego materiału genetycznego poprzez horyzontalny transfer genów?**

Podrozdział 4.3 opisujący konstrukcję zmutowanych szczepów bakteryjnych w moim przekonaniu mógłby znaleźć się w całości w rozdziale Wyniki, jako przygotowanie i weryfikacja modelu badawczego. Za niezwykle cenną w tej części pracy uważam analizę uzyskanych mutantów nie tylko na poziomie DNA ale również poprzez ocenę obecności w mutantach



badanych białek, a także na poziomie mRNA. Zabrakło mi może jedynie oceny poziomu białka ParA w mutancie $\Delta parB$ oraz ParB w mutancie $\Delta parA$, potwierdzających brak zmian w ekspresji tych białek w stosunku do szczepu „typu dzikiego”, szczególnie jeśli geny te sąsiadują ze sobą w genomie *S. venezuelae*. Obecność niewielkich ilości białek ParA i ParB w mutantach posiadających niefunkcjonalne geny Doktorantka tłumaczy (str. 101) niespecyficznością użytego przeciwciała. Jednakże, w dalszej części pracy (str. 136) Autorka pisze o obecności w *S. venezuelae* dodatkowych kopii genów *parA/B* kodowanych poza-chromosomalnie. **Czy słabe prążki widoczne w metodzie „western blot” szczególnie u mutantu $\Delta parB$ nie mogą wynikać z ekspresji tych dodatkowych genów? Czy w szczepie MD004 (str. 105) zawierającym *parA-gfp* analizowano poziom białka ParB? Czy nadprodukcja ParB-GFP w szczepie MD050 nie świadczy o częściowej niefunkcjonalności białka fuzyjnego ?**

Doktorantka w swoich badaniach bardzo umiejętnie wykorzystwała uzyskane mutanty oraz technikę filmów poklatkowych do badań szybkości wydłużania i różnicowania strzępek oraz lokalizacji fluorescencyjnych białek fuzyjnych ParA-GFP, ParB-GFP i FtsZ-GFP w trakcie pełnego cyklu rozwojowego strzępek *Streptomyces*. Monitorowanie lokalizacji białka FtsZ-GFP pozwoliło na śledzenie zaburzeń w tworzeniu przegród poprzecznych w szczepach pozbawionych białek segregacyjnych ParA i ParB. Analizowano także dynamikę formowania filamentu śledząc położenie białka ParA-GFP oraz powstawanie kompleksów nukleoproteinowych z wykorzystaniem białka ParB-GFP. Badania mutantów *S. venezuelae* pozbawionych chromosomalnych genów *parA* i/lub *parB* wykazały znaczenie ParA/B dla prawidłowej segregacji chromosomów i podziałów komórkowych, a także szybkości wzrostu oraz długości sporulujących strzępek. Obserwowany efekt mierzony liczbą przedziałów komórkowych pozbawionych DNA oraz minikompartmentów był jednak dwukrotnie słabszy niż obserwowany wcześniej w mutantach *S. coelicolor*, co Doktorantka tłumaczy obecnością poza-chromosomalnych kopii genów *parA/B* w szczepie *S. venezuelae*. **Czy dodatkowe kopie genów są duplikacją genów chromosomalnych, czy też różnią się od nich sekwencją nukleotydową? Czy nadprodukcja poza-chromosomalnych genów *parA/B* cofnęłaby obserwowany efekt inaktywacji genów chromosomalnych? Z badań przeprowadzonych przez Doktorantkę oraz z licznych prac zespołu jasno wynika znacząca rola białek ParA/B w segregacji chromosomów i podziałach komórkowych. Mimo to w komórkach mutantów, znakomita większość kompartmentów (80-90%) jest prawidłowa, czy można więc**



stwierdzić, że białka te odgrywają jedynie pomocniczą rolę w segregacji chromosomów u *Streptomyces* a ich brak częściowo kompensują inne mechanizmy? Badania Doktorantki przeprowadzone z wykorzystaniem fuzyjnego białka FtsZ-GFP pokazały, że obecność białek ParAB wpływa na przestrzenną organizację oraz czas tworzenia pierścieni Z, a mutanty pozbawione funkcjonalnego białka ParB charakteryzują się zaburzeniami w strukturze przestrzennej pierścieni Z. Bardzo interesujące było także pokazanie zależności pomiędzy obecnością białek ParA/B a kondensacją chromosomów. Z zastosowaniem techniki ChIP-seq Doktorantka potwierdziła „ParA-zależne” wiązanie białka ParB do sekwencji *parS* oraz wykazała wiązanie się ParB pomiędzy miejscami *parS*. Następnie Autorka obserwowała wpływ obniżonego poziomu topoizomerazy I na tempo wzrostu i różnicowanie *S. venezuelae* oraz stopień kondensacji chromosomów. Doktorantka wykazała także, że obniżenie poziomu TopA oraz zwiększenie superskręcenia chromosomu przyspiesza tworzenie pierścieni Z w strzępce. Precyzyjna analiza czasu wzrostu strzępek, osiągniętej długości, szybkości wydłużania, powstawania pierścieni Z, czasu ich trwania, czasu sporulacji i różnicowania pozwoliła stwierdzić, że zmiany w kondensacji chromosomów wpływają na czasowo-przestrzenną organizację pierścieni Z w strzępkach *S. venezuelae* a zwiększona kondensacja DNA może przyspieszać tworzenie pierścieni Z w obszarach wolnych od DNA. Trudno wykluczyć jednak, że obserwowane zmiany wynikają choćby częściowo ze zmian w poziomie ekspresji genów, wynikających z poziomu superskręcenia DNA, kodujących białka regulujące proces polimeryzacji czy lokalizacji FtsZ. Ciekawym byłoby zbadanie transkryptomu i/lub proteomu mutantu z obniżonym poziomem TopA pod kątem poziomu ekspresji potencjalnych białek stabilizujących czy destabilizujących pierścienie Z. **Proszę Doktorantkę o krótki komentarz do powyższej uwagi.**

Ogrom otrzymanych w czasie przeprowadzonych badań wyników, zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych dla konstrukcji i analizy mutantów bakteryjnych, połączonych z analizą filmów poklatkowych pozwalających na śledzenie w czasie zmian zachodzących w pojedynczych strzępkach czy kompartmentach, dowodzi skutecznej realizacji ambitnych celów pracy. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo precyzyjne dobranie układów kontrolnych pozwalających na wyciąganie wiarygodnych wniosków z przeprowadzanych badań.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.



Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę mają silne podstawy w prezentowanych wynikach pracy i można uznać je jako w pełni uprawnione.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Magdaleny Donczew uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Donczew do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani Magdaleny Donczew przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek