

prof. emerytowany

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana mgr. Tomasza Małeckiego**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Współdziałanie białek SMC oraz HupS w organizacji chromosomów podczas sporulacji *Streptomyces venezuelae***

Poznanie genetycznych i molekularnych procesów zachodzących w cyklu komórkowym bakterii jest niezwykle ważnym problemem badawczym. Mechanizmy replikacji, segregacji i podziału komórek należą do najważniejszych procesów komórkowych, a ich prawidłowy przebieg decyduje o przeżywalności mikroorganizmów w określonych środowiskach. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Tomasza Małeckiego została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Wydział Biotechnologii pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Dagmary Jakimowicz.

Badania prowadzone w ramach tej pracy doktorskiej były finansowane z grantu NCN, w ramach programu Opus 16 (2018/31/B/NZ1/00614) p.t. „*Organizacja przestrzenna chromosomu podczas sporulacji Streptomyces - wpływ na podziały komórkowe, segregację chromosomów, przeżywalność i kiełkowanie zarodników*”. Rozprawa doktorska mgr T. Małeckiego jest starannie opracowana pod względem redakcyjnym i edytorskim. Składa się z kilku części wymaganych w pracy doktorskiej, t.j. Streszczenie, (Abstract), Wstęp, bardzo obszerne Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, krótkie Podsumowanie i Bibliografia. Część wyników badań Doktoranta jest zawarta w wieloautorskiej publikacji wysłanej do druku p.t. “*Spatial rearrangement of the Streptomyces venezuelae linear chromosome during sporogenic development*”. Doktorant jest także współautorem pracy opublikowanej w wysoko punktowanym czasopiśmie *Frontiers in Microbiology*, 2019, “*Transcriptional response of Streptomyces coelicolor to rapid chromosome relaxation or long-term*

supercoiling imbalance". Szafran M., Gongerowska M., Małecki T., Elliot M., Jakimowicz D.

Wstęp zawiera opis cyklu życiowego różnych grup bakterii, na który składają się procesy replikacji DNA, kondensacji i segregacji powielonych chromosomów oraz tworzenie przegród podziałowych. Procesy te są zróżnicowane w różnych rodzajach bakterii, ale zawsze prowadzą do powstania pojedynczych komórek zawierających chromosom, lub chromosomy. Podział komórek rozpoczyna się od tworzenia pierścienia podziałowego z udziałem białka FtsZ (homolog tubuliny), co pozwala na prawidłowy podział komórek. Utworzony nukleoid bakterii ma formę kolistą lub liniową, jak w rodzaju *Streptomyces*. Szczególnie ważnym procesem w cyklu podziału bakterii jest przestrzenne upakowanie chromosomu w komórce. Za powstanie i utrzymanie superskręceń DNA odpowiedzialne są różne czynniki środowiskowe oraz polimerazy DNA, RNA i topoizomerazy, co prowadzi do tworzenia pętli DNA. Pętle nukleoidu są stabilizowane przez białka NAP (*Nucleoid Associated Proteins*), które wiążą się nieswoiście z DNA i kondensują oraz częściowo modyfikują podwójną helisę DNA. Poza białkami NAP i topoizomerazami w organizacji chromosomu bakteryjnego uczestniczą kondensyny, czyli wysokocząsteczkowe białka SMC (*Structural Maintenance of Chromosome*), które dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP wpływają na konformację chromosomów.

Doktorant szczegółowo opisał kolejne etapy organizacji chromatyny z udziałem kondensyn i przedstawił czytelne modele aktywności bakteryjnych kompleksów SMC z białkami pomocniczymi prowadzącymi do tworzenia i powiększania pętli DNA. Na zmiany konformacyjne DNA wpływa także jedno z białek NAP - białko HU (*heat-unstable protein*), które stabilizuje zagięcia nici DNA wiążąc się nieswoiście do DNA głównie w regionach o wysokiej zawartości par AT oraz w zagięciach i nietypowych strukturach DNA.

W dalszej części Wstępu, Doktorant opisał bakterie z rodzaju *Streptomyces*, typ promieniowce (*Actinobacteria*), które charakteryzują się złożonym cyklem życiowym i różnymi aktywnościami metabolicznymi o dużym znaczeniu przemysłowym. Bakterie te tworzą wielokomórkową grzybnię wegetatywną, w której powstają wielokrotne kopie chromosomów. Po wyczerpaniu substancji odżywczych tworzy się grzybnia powietrzna z dużą liczbą chromosomów równomiernie

rozmieszczonych wzdłuż sporulujących strzępek. W wielokomórkowej grzybni dojrzewają zarodniki, tworzą się prespory, z których uwalniają się dojrzałe zarodniki.

Obiektem badań Doktoranta były dwa białka HupS i SMC *Streptomyces venezuele* biorące udział w organizacji chromosomu. Białko HupS wiąże się z nukleoidem, a jego delecja zaburza poziom upakowania chromosomu. W kondensacji chromosomu biorą także udział wielkocząsteczkowe białka SMC. Delecja genu *smc* zaburza kondensację i segregację DNA podczas sporulacji oraz powoduje zwiększenie długości nukleoidu, co świadczy o częściowej dekondensacji chromosomu. Ponieważ obydwa geny *hupS* i *smc* mają podobne aktywności, Doktorant zakłada ich synergistyczne działanie w organizacji chromosomów.

Cele pracy wyznaczone przez Doktoranta to zbadanie:

- wpływu mutacji delecyjnych genów *hupS* i *smc* na fenotyp zarodników *S. venezuele* i na kondensację chromosomów podczas sporulacji tych bakterii.
- wpływu aktywności białek SMC i HupS na podziały komórkowe w czasie tworzenia spor oraz wzajemnego oddziaływania białek SMC i HupS na kondensację DNA.

Materiały i Metody to bardzo obszerna (49 str.) część doktoratu, zawierająca opis szczepów, bardzo wielu konstruktów DNA, materiałów biologicznych, technik biologii molekularnej i konstrukcji zmodyfikowanych szczepów *S. venezuele*. Należy podkreślić ogromną staranność w opracowaniu tej części pracy, co może być bardzo dobrym vademecum w różnych badaniach molekularnych.

Wyniki

W analizie wpływu genów i białek SMC i HupS na wzrost i fenotyp zarodników *S. venezuele*, stwierdzono, że delecja genu *smc* nie wpływa znacząco na tempo różnicowania grzybni, natomiast delecja genu *hupS* powodowała tylko mniejsze wybarwienie sporulującej grzybni. Jednak delecja obu genów miała znaczny wpływ na przebieg sporulacji, powodując spowolnienie i zaburzenie tego procesu. W badaniu tempa wzrostu mutantów delecyjnych w genach *smc* lub *hupS* na podłożu płynnym, krzywe wzrostu mutantów były podobne. Delecja obu genów powodowała

znacznie spowolniony wzrost grzybni, co wskazywało na współdziałanie obu białek w dojrzewaniu sporulującej grzybni.

W badaniu wpływu białek SMC i HupS oraz czynników środowiskowych na wielkość spor stwierdzono, że zarówno pojedyncze jak i podwójne delecje genów dla tych białek znacząco wpływają na wielkość spor, co obserwowano w mikroskopii elektronowej i świetlnej. Spory były znacząco większe, a komplementacja tych delecyjnych mutantów przywracała wielkość spor do form dzikich. Wykazano także zwiększoną wrażliwość spor na temperaturę zarówno w przypadku pojedynczych jak i podwójnych delecji *smc* i *hupS* *S. venezuele*. Stwierdzono także, że delecja obu genów spowalnia wzrost hodowli i strzępek oraz powoduje zwiększenie długości zarodników.

Ważną funkcją białek SMC i HupS wiążących się z chromosomem jest ich wpływ na poziom kondensacji chromosomu i formowanie przegród podziałowych w trakcie sporulacji, co badano z wykorzystaniem białek fluorescencyjnych, metodą mikroskopii fluorescencyjnej. Białko FtsZ jest głównym składnikiem pierścieni podziałowych w sporulującej grzybni, dzielącej strzępki na szereg kompartmentów zawierających zarodniki. Wykazano, że delecje genów *smc* i/lub *hupS* powodowały zwiększenie średniej powierzchni i długości chromosomu, co jednak nie wpływało na prawidłowy proces segregacji chromosomów. W tych analizach (ilustrowanych szeregiem zdjęć z użyciem poklatkowej mikroskopii fluorescencyjnej), stwierdzono, że delecje genów *smc* i *hupS* powodują zmiany kondensacji chromosomów, położenia pierścieni podziałowych oraz wpływają na znaczną zmienność poziomu fluorescencji pierścieni podziałowych. Współdziałanie białek SMC i HupS w procesie kondensacji chromosomu prowadzono metodą immunoprecypitacji z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA. Ustalono, że miejsca wiązania obu białek z DNA są różne; białko HupS wiąże się do ramion chromosomu w określonej sekwencji, natomiast wiązanie SMC określono jako dynamiczne. Mimo tych różnic obydwa białka wzajemnie wpływają na wiązanie się z chromosomem.

Dyskusja: Doktorant w tej części pracy zwraca uwagę na zastosowanie zaawansowanych nowych metod w badaniach oddziaływania białek SMC i HupS oraz organizacji chromosomu podczas sporulacji w niebadanym dotychczas gatunku *Streptomyces venezuele*. Użycie mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej

oraz techniki ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation sequencing*) oraz białek fluorescencyjnych pozwoliło na przedstawienie kolejnych etapów dojrzewania wzrostu grzybní prowadzących do tworzenia zarodników.

Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantowi na zaproponowanie modelu, w którym białka SMC i HupS wpływają na wiązanie z DNA i organizację chromosomu w komórkach *S. venezuele*. Białko HupS wiąże ramiona chromosomu i lokalizuje się w tworzących się pętlach DNA, natomiast białko SMC wiążące się początkowo w centralnej części chromosomu, w miarę przesuwania się wzdłuż chromosomu powoduje zbliżanie ramion chromosomu i wypętlanie DNA. Brak genów *smc* i *hupS* powoduje znaczne zaburzenia w kondensacji nukleoidu i zmianę wielkości zarodników.

Pytania dyskusyjne:

1. Czy jest znana sekwencja DNA genów *hupS* i *smc*?
2. Czy były próby izolacji mutantów punktowych *hupS* i *smc* *S. venezuele*?
3. Czy planuje się badanie oddziaływań innych białek z grupy NAP z chromosomem *S. venezuele*?
4. Czy poziom ilości barwnika w zarodnikach ma jakieś znaczenie metaboliczne?

W podsumowaniu, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, wykazuje szeroką wiedzę Pana mgr. Tomasza Małeckiego oraz umiejętność przeprowadzania zaawansowanych i często trudnych badań eksperymentalnych. Chcę podkreślić, że rozprawa została napisana poprawnym, zrozumiałym językiem naukowym (z nielicznymi 'literówkami') z dbałością o poprawność gramatyczną. Na szczególną pochwałę zasługuje opracowanie precyzyjnych i czytelnych rysunków i zdjęć w całej pracy doktorskiej.

Oceniana rozprawa Pana mgr. Tomasza Małeckiego spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 18.03.2011 r. o stopniach i tytułach naukowych, a dotychczasowe osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej uzasadniają nadanie doktorantowi **stopnia naukowego doktora.**

W związku z tym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. Tomasza Małeckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową i znaczenie poznawcze pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska