



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

Gdańsk, 20.06.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Marty Kołodziej
„Rola białka Lsr2 w organizacji chromosomu i regulacji ekspresji genów
u *Mycobacterium smegmatis*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, jako podstawa ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora, została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem promotora, Pani prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Jako główny cel rozprawy określono scharakteryzowanie roli białka Lsr2 u *Mycobacterium smegmatis*. Szczegółowe cele pracy dotyczyły zbadania funkcji tego białka jako potencjalnego organizatora chromosomu oraz czynnika regulującego ekspresję genów. *M. smegmatis* jest organizmem modelowym dla rodzaju *Mycobacterium*, który zawiera między innymi bardzo ważne dla zdrowia publicznego bakterie patogeniczne jak np. *M. tuberculosis*. Specyfika tej grupy mikroorganizmów przejawia się zarówno w ich budowie, jak i procesach molekularnych przystosowań do środowiska, gdy jednocześnie podstawowe funkcje jednokomórkowych organizmów pozostają zachowane. Dlatego badania charakterystycznych dla tego rodzaju bakterii mechanizmów komórkowych czy specyficzności w regulacji procesów życiowych spełnia dwa istotne cele: jak najlepsze poznanie tej grupy

mikroorganizmów dla celów poznawczych i terapeutycznych oraz określenie możliwych wspólnych, uniwersalnych dla wyższych grup taksonomicznych procesów. Te cele spełniają między innymi badania nad organizacją materiału genetycznego bakterii, gdzie różne mechanizmy i białka spełniają analogiczne i homologiczne funkcje upakowania chromosomów bakteryjnych, jednocześnie uczestnicząc w skomplikowanych procesach regulacji ekspresji genów i replikacji DNA. To właśnie procesy związane z funkcjonowaniem materiału genetycznego, w tym maszynierii replikacyjnej u różnych, także nietypowych, grup bakterii, są od lat przedmiotem badań w zespole Pani profesor Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Badania te prowadzone są z wykorzystaniem różnorodnych, najnowocześniejszych metod genetycznych, biochemicznych i biologii molekularnej, pozwalając na uzyskiwanie najwyższej jakości wyników. Rozprawa doktorska Pani mgr Kołodziej wpisuje się w pełni w ten nurt badawczy, korzystając z pełnego zakresu wiedzy i metodologii stosowanej w zespole Pani Promotor.

Rozprawa ma postać trzech wieloautorskich publikacji opatrzonej streszczeniem w języku polskim i angielskim, oraz poprzedzonych wprowadzeniem. Prace składające się na rozprawę zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Taka postać rozprawy doktorskiej jest zgodna z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (z późniejszymi poprawkami). Wymogi te stanowią, iż rozprawa może stanowić część prac zbiorowych, wyodrębnioną z tych publikacji, gdzie odpowiedni wkład Kandydata został wykazany w zakresie przygotowania założeń pracy, wykonaniu stosownych eksperymentów, opracowaniu rezultatów pracy i przedstawienia oraz przedyskutowania wniosków. Dla określenia wkładu kandydata służą oświadczenia wskazujące na udział poszczególnych współautorów prac, potwierdzone podpisem Doktorantki oraz autora korespondencyjnego a także szczegółowy opis wkładu Kandydatki w realizację prac przedstawiony w dwóch publikacjach jako Authors contributions. Na podstawie tych dokumentów można bez wątplenia stwierdzić, iż Pani mgr Marta Kołodziej pełniła istotną rolę w każdej ze składających się na rozprawę publikacji. W związku z czym należy, iż wymogi formalne określone w ustawie zostały spełnione. Zaś fakt, iż ukazały się już one w recenzowanych czasopismach świadczy, iż zostały nie tylko pozytywnie ocenione, ale także przedstawione środowisku naukowemu.

Na rozprawę składają się dwie prace eksperymentalne i jedna przeglądowa. Prace eksperymentalne ukazały się w 2021 roku w Scientific Reports i w mSphere, czasopismach

międzynarodowych o uznanej renomie. W tych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej udział w powstaniu prac został określony na odpowiednio 60 i 70 %. Dotyczył on opracowania koncepcji pracy, wykonania eksperymentów, analiz uzyskanych wyników, przygotowania wraz z Promotorem manuskryptu. Trzecia praca to publikacja przeglądowa, która została opublikowana w polskojęzycznym czasopiśmie Postępy Biochemii. W niej udział Kandydatki to 50 %, jest ona także pierwszym autorem tej pracy. Wszystkie trzy prace łączy jedna tematyka udziału białek w organizacji materiału genetycznego bakterii. Białka te uczestniczą zarówno w fizycznym upakowaniu DNA, jak również w procesach regulacyjnych, związanych z ekspresją genów i powielaniem materiału genetycznego. Są wśród nich białka wykazujące szerokie podobieństwa u licznych grup bakterie, jak i takie, które są specyficzne dla danych grup taksonomicznych. Białko Lsr2, będące obiektem badań Doktorantki, charakterystyczne dla promieniowców, jest homologiem białka histopodobnego H-NS. Jego funkcjonowanie w komórce *M. smegmatis*, jak wykazały badania Doktorantki, jest związane z zmianami lokalizacji podczas cyklu życiowego bakterii, gdy białko to wiąże się do chromosomu, zaś do efektywnego wiązania służy N-terminalna domena białka. Zestaw interesujących danych został uzyskany przez zastosowanie mutantu pozbawionego funkcjonalnego białka Lsr2. Badania przedstawione w rozprawie w publikacji 1 (Sci. Rep) pokazały, iż komórki mutantu *lsr2* charakteryzują się zmienioną morfologią dotyczącą kształtu komórek oraz kolonii bakteryjnych, oraz czasu i dynamiki replikacji DNA, co wraz z obrazem mikroskopowym sugeruje zaangażowanie Lsr2 w przestrzenną organizację nowo syntetyzowanego DNA. Te bardzo ważne informacje zostały rozszerzone o szczegółową analizę transkryptomiczną szczepów wt i mutantu (praca 2, mSphere). Głównym stwierdzeniem wynikającym z tych porównań jest, iż Lsr2 pełni rolę w regulacji ekspresji genów, wpływając m. in. na budowę otoczki komórkowej, specyficznej dla mykobakterii. Takie zmiany w budowie otoczki związane są ze zmianami jej przepuszczalności na przykład na antybiotyki, co skutkuje zmienioną wrażliwością na leki. Interesująco, wykazana została regulacja ekspresji genów przez Lsr2 w warunkach obniżonego poziomu tlenu czyli hipoksji, co świadczy o zaangażowaniu tego białka w odpowiedź na warunki stresowe. Ciekawą obserwacją przedstawioną w tej rozprawie jest aktywacja ekspresji genu paraloga LsrR, białka MSMEG_1060, u mutantu delecyjnego *lsr2*. Została przedstawiona hipoteza, iż białko MSMEG_1060 zabezpiecza chromosom bakteryjny w warunkach stresu. Wyniki badań przedstawione w rozprawie zostały uzyskane przy zastosowaniu szeregu najnowocześniejszych

metod biologii molekularnej, w tym bardzo użytecznej metody mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym, mikroskopii lokalizacji fotoaktywowalnej PALM, immunoprecypitacji chromatyny (ChiP-seq), czy RNA-seq. Metody zostały zastosowane prawidłowo, a wnioski wynikające z uzyskanych wyników przedstawione są interesująco i zawierają wiele ciekawych hipotez. Zwraca uwagę staranne przygotowanie zaplecza genetycznego odpowiednich szczepów – mutantów oraz konstruktów do nadprodukcji białek. Wchodząca w skład rozprawy praca przeglądowa podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat czynników wpływających na organizację bakteryjnego chromosomu, stanowiąc interesujące uzupełnienie do badań eksperymentalnych.

Do przedstawionych wyników badań miałabym kilka pytań, o odpowiedź na które poprosiłabym podczas obrony:

1. Białko Lsr2 jest zaangażowane w odpowiedź komórki na obniżony poziom tlenu, a także ma wpływ na wrażliwość na antybiotyki. Taki związek z odpowiedzią na czynniki stresowe nasuwa pytanie o związek działania białka Lsr2 z globalną odpowiedzią ścisłą? Czy jego ekspresja zależy od poziomu ppGpp w komórce, lub, czy aktywność odpowiedzi ścisłej może być modulowana przez Lsr2?
2. Plejotropowe działanie Lsr2 wskazuje, iż jego rola może obejmować odpowiedzi na wiele czynników stresowych. Czy nie byłoby uzasadnione wykonanie szerokokresowej analizy efektów fenotypowych braku Lsr2 typu BIOLOG, aby zidentyfikować możliwe inne zmiany u mutanta delecyjnego *lsr2*?
3. Czy białko Lsr2 może wpływać na regulację aktywności białka MSMEG_1060? Czy ekspresja genu białka MSMEG_1060 może być bezpośrednio regulowana przez Lsr2?
4. Białko Lsr2 jak i MSMEG_1060 mają zdolność wiązania DNA – czy można – poza składem w postaci zawartości par AT/GC określić przybliżoną specyfikę rozpoznawanych sekwencji?
5. Jednym ze stanów stresowych, gdzie funkcje Lsr2 wydaje się konieczna, jest stan obniżonego poziomu tlenu. Czy w warunkach, gdzie zazwyczaj bytuje *M. smegmatis*, taki stan hipoksji może występować powszechnie i czy taka rola Lsr2 może mieć znaczenie ewolucyjne?

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona do oceny rozprawa stanowi ważny wkład w poznanie mechanizmów organizacji chromosomu bakteryjnego, a zastosowane metody badawcze i zaprezentowane wyniki wnoszą bardzo istotne informacje dla stanu wiedzy o *Mycobacterium* jak i białkach uczestniczących w upakowaniu materiału genetycznego bakterii. Przedstawione prace pokazują, iż Doktorantka posiada umiejętności odpowiedniego prowadzenia badań naukowych, formułowania wniosków, zaś wyniki jej pracy zostały już pozytywnie ocenione przez recenzentów jej publikacji. Podkreślić należy wysoki poziom naukowy badań, wynikający z odpowiednio zastosowanych metod. W związku z tym, mogę stwierdzić z pełnym przekonaniem, iż osiągnięcie naukowe przedstawione w rozprawie spełnia wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora przez Ustawę z 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami i uzupełnieniami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Marty Kołodziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie zwracając się z wnioskiem o stosowne wyróżnienie rozprawy z uwagi na poziom i znaczenie zaprezentowanych badań.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Palasz