

Gdańsk, 07.04.2021r

prof. dr hab. Michał Obuchowski  
Zakład Bakteriologii Molekularnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Dębinki 1  
80-211 Gdańsk

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

Rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Małeckiego zatytułowana „Współdziałanie białek SMC oraz HupS w organizacji chromosomów podczas sporulacji *Streptomyces venezuelae*” jest oryginalnym opracowaniem liczącym 138 numerowanych stron napisana w języku polskim. Praca jest poprzedzona dwujęzycznym streszczeniem i podzielona w sposób typowy dla doświadczalnych prac badawczych.

Kwasy nukleinowe będące jedynym opisanym do tej pory nośnikiem informacji genetycznej mają stosunkowo prostą budowę chemiczną. Informacja zawarta w kolejności zasad azotowych ma charakter liniowy. Z tego powodu cząsteczka bądź cząsteczki kwasów nukleinowych składające się na genom organizmu posiadają znaczne długości, nie rzadko przekraczające 1000 krotnie rozmiar organizmu lub komórki. Przechowywanie i manipulowanie tak dużymi polimerami wymaga precyzji oraz dobrej organizacji tej cząsteczki. Z tego powodu żywe organizmy wypracowały złożony system białek, umożliwiający taką organizację przestrzenną materiału genetycznego, która stanowi kompromis między jego bezpieczeństwem, zajmowaną przestrzenią a dostępnością zawartej w nim informacji. Pewną ironią jest obecna sytuacja, w której posiadamy więcej informacji o sposobie organizacji materiału genetycznego organizmów eukariotycznych w porównaniu do prokariotycznych pomimo ich względnie małych genomów. Z takiej perspektywy przeprowadzone badania i uzyskane wyniki przez Pana Tomasza Małeckiego stanowią przyczynek do wyrównania poziomu wiedzy pomiędzy tymi grupami organizmów.

### **Wstęp**

Ten rozdział liczy 17 stron i zawiera osiem rycin. Autor umiejętnie wprowadza czytelnika w zagadnienie, które będzie stanowiło obiekt jego badań. Aby przygotować czytelnika do analizy podjętego problemu autor przedstawia mechanizmy podziału różnych gatunków bakterii wraz ze sposobem zapewnienia odpowiedniej lokalizacji materiału genetycznego. Następną omawianą kwestią jest organizacja przestrzenna materiału genetycznego w komórce bakterii i rola różnych klas białek zaangażowanych w ten proces. W

dalszej części zostaje szczegółowo opisana budowa i funkcja białek utrzymujących strukturę chromosomu. W tym miejscu chciałbym prosić o wyjaśnienie, czy rzeczywiście białka zawierające motywy Walker A i B hydrolizują DNA (str. 17)? Mam wrażenie, że są one związane z hydrolizą innej cząsteczki obecnej w komórce, proszę o skomentowanie tego podczas obrony. W końcowej części wstępu Pan Małecki nakreśla cykl życiowy bakterii z rodzaju *streptomyces* oraz granicę obecnej wiedzy na temat organizacji chromosomu u tych bakterii. Rozdział ten czyta się z ciekawością, a po zakończonej lekturze czytelnik jest świadomy jakie zagadnienia będą analizowane w dalszej części dysertacji.

### **Cel pracy**

Jest sformułowany w postaci czterech jasno sformułowanych pytań, na które Autor będzie poszukiwał odpowiedzi.

### **Materiały i metody**

Rozdział ten liczący aż 49 stron zawiera wyczerpujący spis lub opis wykorzystanych szczepów, oligonukleotydów, aparatury oraz procedur doświadczalnych wykorzystywanych podczas prac opisanych w rozprawie doktorskiej. Pewne uwagi można mieć do języka stosowanego w tym rozdziale, który zawiera nieco żargonu laboratoryjnego (Aparat do elektroforezy DNA zamiast aparat do elektroforezy poziomej lub agarozowej, namnażanie DNA zamiast powielanie DNA czy „temperatura indukująca usunięcie plazmidu”). Drobną nieścisłością, są podane warunki transferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę (str. 53), gdzie Autor podaje „...przy stałym napięciu 25V i natężeniu 1,3A.”. Podczas transferu półsuchego, jaki był zastosowany, zmienia się oporność „kanapki” co prowadzi do zmian w napięciu i natężeniu prądu. Opisane wartości są prawdopodobnie warunkami początkowymi zastosowanymi w pracy.

Rozdział ten zawiera również opis skonstruowanych mutantów *Streptomyces venezuelae* niezbędnych do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Umieszczenie tych opisów (przejrzystych i klarownych) w rozdziale Materiały i metody wydaje mi się niespotykane. W mojej ocenie, widziałbym je raczej w rozdziale „Wyniki”, ponieważ uzyskanie tych szczepów było niezbędne do dalszych prac oraz stanowi wynik pracy doktoranta. Co więcej, prawdopodobnie ich uzyskanie zabrało więcej czasu niż przeprowadzenie opisanych w kolejnym rozdziale doświadczeń.

### **Wyniki**

Na 38 stronach zawierających liczne zdjęcia, wykresy i tabele pan Małecki przedstawia uzyskane wyniki wskazujące na istotną rolę białek HupS i Smc w organizacji chromosomu *S. venezuelae*. W różnorodnych wynikach zaprezentowano wpływ delekcji genów kodujących te białka na wielkość spor, ich wytrzymałość na temperaturę, szybkość kiełkowania oraz stabilność pierścienia białka FtsZ w dzielących się komórkach. Autor przeprowadził również pomiary powierzchni zajmowanej przez chromosom w szczepach typu dzikiego oraz

mutantach delecyjnych i wykazał, że brak białek HupS i Smc powoduje powiększenie przestrzeni zajmowanej przez chromosom, a więc prawdopodobnie na jego mniejsze upakowanie w komórce. Analiza miejsc wiązania się badanych białek do DNA chromosomalnego wykazała również ich zróżnicowane preferencje w stosunku do regionów genomu (część centralna, części dystalne). Zaprezentowane doświadczenia zostały starannie przeprowadzone i szczegółowo opisane. Wnioski wyciągane na podstawie zaprezentowanych wyników są dobrze wyważone. Jeśli nie wszystkie wyniki/prace/szczepy/plazmidy zostały przygotowane przez Autora jest to szczegółowo zaznaczone.

Mimo starannej redakcji tekstu tego rozdziału mam kilka pytań.

Czy opisując zróżnicowanie zabarwienia hodowli (str. 79, dół) za szczep dziki został uznany TM003?

Jak interpretuje Pan spadek tempa wzrostu przedstawiony na rys. 5.2 dotyczący szczepów  $\Delta hupS\Delta smc$ , FtsZ-YPet i  $\Delta hupS\Delta smc$ , FtsZ-YPet; HupA-mCherry w stosunku do szczepu  $\Delta hupS\Delta smc$ ?

Czy wzrost zajmowanej powierzchni o 10% w tle genetycznym  $\Delta hupS\Delta smc$  należy rozumieć jako zmianę dużą czy małą? Kontynuując ten wątek czy utrata/inaktywacja wszystkich białek zaangażowanych w organizację przestrzenną chromosomu *S. venezuelae* nie powinna spowodować efektu letalnego?

## Dyskusja

Na 9 stronach tego rozdziału Autor przedstawia uzyskane wyniki na tle dostępnych danych uzasadniając konieczność zmiany organizmu modelowego *S. coelicolor* na *S. venezuelae*. Następnie odnosi się do kolejnych wątków swojej pracy eksperymentalnej konfrontując własne wyniki z dostępnymi informacjami w literaturze przedmiotu wskazując możliwości kontynuacji badań np. analiza ilości kopii DNA chromosomalnego w sporach wytwarzanych przez szczepy pozbawione białek HupS i Smc. Rycina 6.1. przedstawia schemat współpracy białek HupS i Smc w organizacji przestrzennej chromosomu *S. venezuelae* oraz wskazuje na jego zaburzenia w mutantach analizowanych w pracy. Rozdział ten jest napisany przejrzysto i dowodzi znajomości literatury przedmiotu przez doktoranta. Po dyskusji zamieszczone jest jednostronicowe podsumowanie uzyskanych wyników.

## Literatura

Kolejne 9 stron zawiera spis cytowanej literatury zawierający 88 pozycji. Uwagę zwraca fakt, że przeważająca większość cytowanych artykułów została opublikowana w XXI wieku, a więc zawiera opis najnowszych odkryć. Jedynym mankamentem tego rozdziału jest pominięcie kursywy w nazwach rodzajowych i gatunkowych występujących w tytułach cytowanych prac.

## Załączniki

Praca kończy się 3 mapami plazmidów wykorzystywanych przy konstruowaniu mutantów *S. venezuelae*. Moim zdaniem, ich dołączenie jest bardzo dobrym pomysłem. Jednak, dlaczego dwa ostatnie mają taką samą numerację, tj. 7.2.?

Rozprawę doktorską Pana mgr. Tomasza Małeckiego przeczytałem z przyjemnością i zainteresowaniem. Uważam, że przedstawiony materiał dowodzi sprawności eksperymentatora jak również dojrzałości badacza, który krytycznie ocenia uzyskane przez siebie wyniki. W związku z powyższym mogę z całą pewnością stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi pracy doktorskiej określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2013 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (Dz.U. nr 65, poz. 595, Dz.U nr 164 poz. 1365, Dz.U nr 84 poz. 455 z późniejszymi zmianami). Dlatego też wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana magistra Tomasza Małeckiego do dalszych części przewodu doktorskiego.

*M. Ochodowski*