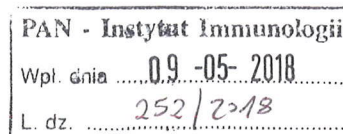


Dr hab. Anna Brzostek
Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*
Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź



7. 05. 2018 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Hołówki pt. „Rola białka HupB w organizacji chromosomu *Mycobacterium smegmatis*”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu pod kierunkiem Prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Promotor pracy, jak i kierowany przez nią zespół to uznany na świecie autorytet w dziedzinie replikacji i segregacji materiału genetycznego bakterii. Realizacja pracy doktorskiej w tak znakomitym zespole stawia przed Doktorantką wysokie oczekiwania, które zmierzają do rozwiązania nowych, merytorycznych problemów naukowych. Jednocześnie, Doktorantka przystępując do wykonania celów pracy doktorskiej miała do dyspozycji bardzo dobry warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową i co zasługuje na podkreślenie wiedzę i doświadczenie naukowe promotora.

Pracę doktorską Pani mgr Joanny Hołówki stanowi zbiór dwóch prac eksperymentalnych, spójnych tematycznie, opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku cytowalności IF ok. 11 oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w języku polskim. We wszystkich załączonych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do Jej kluczowej roli w realizacji opisywanych badań.

Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest białko HupB, należące do grupy białek związanych z nukleoidem (NAP) i jego udział w organizacji chromosomu podczas cyklu komórkowego *M. smegmatis*. Ten przedstawiciel szybko rosnących mykobakterii, stanowi organizm modelowy dla badań prątków gruźlicy. Z uwagi na wciąż istotny problem kliniczny jakim są prątki gruźlicy, jak również brak wiedzy na temat unikatowej, C końcowej domeny białka HupB, oraz ograniczoną wiedzę o procesie replikacji DNA u tej grupy organizmów i specyficzne cechy podziałów komórkowych mykobakterii uważam, że wybrana tematyka badań



jest interesująca i aktualna. Badania lokalizacji białka HupB *M. smegmatis* i mutantu pozbawionego C-końcowej domeny zostały przeprowadzone z wykorzystaniem technik mikroskopii fluorescencyjnej oraz rekombinowanych szczepów bakteryjnych umożliwiających ekspresję analizowanego białka w fuzji z białkami fluorescencyjnymi.

Załączone publikacje stanowiące podstawę recenzowanej pracy doktorskiej zostały poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz krótkim wprowadzeniem opisującym cele naukowe i najważniejsze osiągnięcia prezentowanych prac. Doktorantka cytując odpowiednią literaturę stwierdza (str. 8), że „usunięcie genu *hupB* jest letalne dla prątków w czasie infekcji makrofagów a u *M. smegmatis* powoduje zwiększoną wrażliwość na warunki stresowe...” **Czy Doktorantka mogłaby skomentować i wyjaśnić mechanizm nabywania wrażliwości *M. smegmatis* na opisywane warunki stresowe związane z brakiem białka HupB, jak również jego udział w infekcji makrofagów przez prątki gruźlicy?** Ponadto Doktorantka wspomina o możliwości wykorzystania HupB jako „celu dla antybiotykoterapii w leczeniu gruźlicy”. **Dlaczego Doktorantka uważa, że białko HupB jest dobrym kandydatem, celem do poszukiwania nowych leków przeciwprątkowych? Jakie badania należałoby przeprowadzić aby zweryfikować tak postawioną hipotezę?**

W pracy eksperymentalnej opublikowanej w *mBio* (Hołówka i wsp., 2017) zostały przeprowadzone globalne analizy wiązania białka HupB na chromosomie *M. smegmatis* z wykorzystaniem rekombinowanych szczepów *M. smegmatis* poddających ekspresji białko HupB i mutantu pozbawionego C-końcowej domeny w fuzji z odpowiednimi białkami zielonej i czerwonej fluorescencji. Zastosowanie mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym oraz mikroskopii wysokorozdzielczej pozwoliło na bezpośrednie śledzenie w pojedynczych komórkach lokalizacji białka HupB na chromosomie. Bardzo dobrze zaplanowane eksperymenty, począwszy od globalnej analizy wyznaczania miejsc wiązania białka HupB z wykorzystaniem techniki immunoprecypitacji chromatyny *in vivo* połączonej z głębokim sekwencjonowaniem (CHIP-seq), poprzez ekspresję białek fuzyjnych z natywnych promotorów, a także opracowana metoda obrazowania komórek bakteryjnych pozwoliła na precyzyjne określenie lokalizacji HupB na chromosomie *M. smegmatis* w szczególności w regionach *oriC*, jak również wykazanie bezpośredniego udziału domeny C-końcowej białka w wiązaniu się do DNA *in vivo*. Imponująca wiedza i doświadczenie zespołu w badaniach nad

organizacją chromosomu bakteryjnego pozwoliła na właściwe zinterpretowanie wielu wyników pozyskanych z eksperymentów w postaci zdjęć i filmów.

Druga praca eksperymentalna opublikowana w *Journal of Bacteriology* (Hołówka i wsp., 2018) jest kontynuacją i poszerzeniem badań Doktorantki opublikowanych w poprzedniej pracy. W pracy tej Autorzy wykorzystują białko HupB w fuzji z białkiem zielonej fluorescencji (eGFP) lub czerwonej fluorescencji (mCherry) w celu śledzenia dynamiki zmian zachodzących na chromosomie *M. smegmatis* bezpośrednio w trakcie cyklu komórkowego poprzez obserwację *oriC* i „maszynerii” replikacyjnej. Autorzy posługując się technikami mikroskopii fluorescencyjnej wykazali asymetryczne położenie chromosomu w komórce podczas większości etapów cyklu komórkowego, bliżej nowego bieguna komórki, w odróżnieniu od *oriC* lokalizowanego bliżej starego bieguna komórki. **W związku z tym, iż regiony *oriC* są segregowane w chromosomie mykobakteryjnym w sposób asymetryczny, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, a w załączonej publikacji zostało zobrazowane za pomocą mikroskopii fluoroscencyjnej, prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie jakie inne metody walidacji mogą być wykorzystane dla wykazania powyższych obserwacji?**

Konstrukcja białek fuzyjnych HupB-eGFP, ParB-mCherry oraz DnaN –mCherry umożliwiła Autorom obserwację dynamiki procesu replikacji w pojedynczej komórce w czasie rzeczywistym i ujawniła, że rozpoczęcie nowej rundy replikacyjnej ma miejsce wcześniej niż rozdzielenie siostrzanych chromosomów prowadząc do dziedziczenia częściowo zduplikowanych chromosomów. Kolejne badania pozwoliły na wykazanie wpływu białka HupB na dynamikę inicjacji procesu replikacji wskazując na jego opóźnienie w przypadku szczepów pozbawionych funkcjonalnego białka HupB lub jego C-końcowej domeny, co w konsekwencji przyczynia się do wydłużenia czasu podziału komórkowego.

Trzecia załączona praca, to praca przeglądowa opublikowana w *Post. Hig. Med. Dośw.* (Hołówka J, Płachetka M, 2017). Stanowi ona opis białek odpowiedzialnych za organizację chromosomu bakteryjnego, ze skupieniem uwagi na białkach NAP, a także zawiera opis nowoczesnych, wysokorozdzielczych metod mikroskopii stosowanych do analiz oddziaływań DNA–białko oraz wysokoprzepustowych metod analiz DNA umożliwiających prowadzenie badań nad organizacją i dynamiką chromosomu bakteryjnego, również w aspekcie oddziaływań przestrzennych mikro- i makrodomen (metody 3C, 4C, 5C i Hi-C). Praca ta z pewnością będzie

mogła zostać wykorzystana jako cenne źródło podstawowych informacji o nowych technikach stosowanych w badaniach organizacji chromosomu bakteryjnego. W trakcie pisania pracy wkradł się drobny błąd językowy dotyczący nieprawidłowego określania DNA pamiętając, że jest to rzeczownik rodzaju męskiego.

Lektura pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Hołównki stanowi bardzo interesujący zbiór wielu ważnych wyników, a ich profesjonalne omówienie i przedstawienie w postaci zdjęć, wykresów, rycin i filmów, jak również właściwie wyciągnięte wnioski z otrzymanych wyników i prawidłowo przeprowadzona dyskusja świadczą o znakomitej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań.

Na zakończenie chciałabym poprosić **Doktorantkę o podzielenie się podczas publicznej obrony swoimi przemyśleniami na poniższe kwestie:**

- Czy planuje Pani sprawdzić organizację i dynamikę chromosomu u wolnorosnących przedstawicieli *Mycobacterium*, w kontekście białka HupB?
- Czy znane są oddziaływania białka HupB z innymi białkami prątków, w jakich innych procesach komórkowych to białko może brać udział?
- W jaki sposób białko HupB może być zaangażowane w mechanizm nabywania oporności prątków na izoniazyd?

Podsumowanie:

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Joanny Hołównki uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN o dopuszczenie mgr Joanny Hołównki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjętą tematykę badań i uzyskanie niezwykle ważnych wyników oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani mgr inż. **Joanny Hołównki** przewidzianą w regulaminie nagrodą.

