

26. 11. 2018 r.

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

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	28-11-2018
L. dz.	520/2018

**Ocena pracy doktorskiej mgr Moniki Pióro pt. „Analiza gatunkowo swoistych oddziaływań białek zaangażowanych w segregację chromosomu *Mycobacterium*”.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu pod kierunkiem Prof. dr hab. Dagmary Jakimowicz. Promotor pracy, jak i kierowana przez nią grupa, to uznany na świecie autorytet w dziedzinie replikacji i segregacji materiału genetycznego bakterii. Realizacja pracy doktorskiej w tak wybitnym zespole stawia przed Doktorantką nowe, wysokie cele badawcze, które zmierzają do rozwiązania pionierskich, merytorycznych problemów naukowych. Jednocześnie, należy podkreślić, że ze względu na dostęp do bogatego, wyszukanego warsztatu badawczego, niezbędnej aparatury naukowej i co istotne, do wiedzy i doświadczenia naukowego promotora, stawiane przed Doktorantką oczekiwania są również bardzo wysokie.

Zespół badawczy, w którym Doktorantka realizowała swój projekt, jest autorem szeregu świetnie opublikowanych prac z zakresu segregacji chromosomów, replikacji DNA wykonanych na modelowych organizmach *Streptomyces coelicolor*, a także *Mycobacterium smegmatis*.

Celem badań Doktorantki było poznanie roli oddziaływania pomiędzy białkami ParA i DivIVA u *M. smegmatis*. Cel ten realizowano poprzez zaproponowanie szeregu badań, które zmierzały min. do odpowiedzi na pytania czy modyfikacje białka ParA (brak wiązania ATP i DNA) mają znaczenie w jego oddziaływaniu z DivIVA; jakie aminokwasy są bezpośrednio odpowiedzialne za to oddziaływanie; jak brak oddziaływania pomiędzy badanymi białkami wpływa na procesy segregacji chromosomów i inne procesy cyklu komórkowego?

Układ tekstu rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Pióro jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze napisanym 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 *Mycobacterium*, ze szczególnym uwzględnieniem cyklu komórkowego tych bakterii. Ostatni podrozdział Wstępu, poświęcony jest aktualnej wiedzy na temat białka DivIVA *M. smegmatis* i jest jednocześnie uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej. Wstęp pracy jest napisany ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również przemyślany i związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi autorki. Jedynie w podrozdziale 2.2.1. Wstępu (str. 24) Doktorantka w sposób zbyt ogólny charakteryzuje wolno rosnące prątki, w moim przekonaniu ta część powinna zostać pominięta z uwagi na nie do końca precyzyjne informacje.

**Na str. 29 Doktorantka napisała ”W przypadku *M. tuberculosis*, oba geny, *parA* jak i *parB* są niezbędne do przeżycia (DeJesus i wsp., 2017). Co ciekawe, białka *ParA* oraz *ParB* z *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* charakteryzują się wysoką homologią sekwencji aminokwasowej (77% i 71% podobieństwa białkowego), więc być może w komórkach *M. smegmatis* są inne czynniki zaangażowane w segregację chromosomów (Casart i wsp., 2008)”. Prosiłabym Panią o rozszerzenie tej wypowiedzi, czy są znane inne białka segregacji chromosomów u prątków wolno- i szybko rosnących?**

W rozdziale „Materiały i Metody” autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie i szczegółowo opisane umożliwiając ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie w pracy mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym i mikroskopii wysokorozdzielczej do obrazowania pojedynczych komórek bakteryjnych oraz technik biologii molekularnej, co pozwala przypuszczać, że Doktorantka w czasie realizacji pracy zdobyła szerokie doświadczenie nie tylko w metodach obrazowania, ale również w pracy laboratoryjnej z kwasami nukleinowymi oraz białkami. Na uwagę zasługuje długa lista skonstruowanych plazmidów (Tab. 1) oraz szczepów *M. smegmatis* (Tab. 2) noszących wybrane, zmodyfikowane lub natywne geny w fuzji z różnymi białkami fluorescencyjnymi, zastosowanych do badań i w dużej mierze przygotowanych przez Doktorantkę.

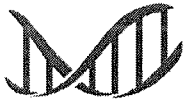
Moim zdaniem ogrom pracy włożonej w przygotowanie konstruktów umożliwiających badanie kolokalizacji białek fuzyjnych w *E. coli* (str. 47), a tym bardziej mutantów delecyjnych i szczepów nadprodukcujących badane białka *M. smegmatis* (str. 57, 58) mógłby znaleźć się w całości w rozdziale Wyniki, jako przygotowanie i weryfikacja modelu badawczego. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę Doktorantki na niejasny opis dotyczący „Zastosowania homologicznej



rekombinacji do wprowadzenia zmian na chromosomie *M. smegmatis*. Konstrukcja szczepów DJMP06 oraz MP16” (str. 57). Szczep DJMP06 ma inny genotyp w zamieszczonej Tab. 4.2 niż w prezentowanym tekście, proszę Doktorantkę o sprostowanie? Jednocześnie chciałabym zapytać czy genotyp mutantów delecyjnych został potwierdzony wyłącznie z wykorzystaniem techniki PCR? Czy Southern blott nie byłby bardziej odpowiednią techniką dla potwierdzenia genotypów uzyskanych mutantów? Dlaczego w metodzie Western blotting (rys. 4.7, str. 61) w szczepach MP16 i MP09 pozbawionych białka ParA są widoczne prążki odpowiadające ParA, czego nie obserwuje się dla szczepu kontrolnego *M. smegmatis* czy szczepu delecyjnego? Czy mogłaby Pani skomentować otrzymane wyniki?

Doktorantka w swoich badaniach bardzo umiejętnie wykorzystwała uzyskane mutanty produkujące białka fuzyjne oraz technikę filmów poklatkowych do badań lokalizacji białek ParA, ParB, DivIVA w komórce, a co za tym idzie do badań segregacji chromosomów, wydłużania komórki i innych procesów komórkowych *M. smegmatis*. Z uwagi na wysoką konserwatywność białka ParA u bakterii zidentyfikowano odpowiednie aminokwasy w białku ParA *M. smegmatis* zaangażowane w wiązanie i hydrolizę ATP oraz nieswoiste wiązanie do DNA. Następnie wprowadzono mutacje powodujące wymianę lizyny zaangażowanej w wiązanie ATP na alaninę (ParAK44A), kwasu asparaginowego zaangażowanego w hydrolizę ATP na alaninę (ParAD68A) oraz argininy odpowiedzialnej za nieswoiste wiązanie do DNA na kwas glutaminowy (ParAR219E) i analizowano oddziaływanie mutantów ParA z DNA w komórkach *E. coli* poprzez obserwacje mikroskopowe zielonej fluorescencji fuzyjnych białek EGFP-ParA. Czy Doktorantka planuje wykorzystać inne metody *in vitro* dla potwierdzenia oddziaływań zmutowanych białek z DNA? Pani mgr Monika Pióro wykazała, wykorzystując system BTH, że mutacje K44A, D68A, R219E w białku T25-ParA wpływają z różną siłą na oddziaływanie z T18-DivIVA. W tym miejscu poproszę Doktorantkę o odpowiedź na pytanie czy znane są inne metody, niż BTH, dla potwierdzenie siły oddziaływań pomiędzy białkami?

Kolejnym ważnym zadaniem badawczym podjętym przez Doktorantkę była identyfikacja mutacji T3A w białku ParA odpowiadającej za oddziaływanie z DivIVA, a także wykazanie jej wpływu na lokalizację białka ParA w komórkach *E. coli* i *M. smegmatis*. Ponadto przeprowadzono analizy wpływu mutacji ParA zaburzających wiązanie i hydrolizę ATP oraz hamujących oddziaływanie z DNA na: lokalizację fluorescencyjnego białka fuzyjnego EGFP-ParA, mobilność ParA, segregację chromosomów, elongację komórek i podziały komórkowe *M. smegmatis*. Po tej części Wyników zobrazowanych w sposób doskonały analizami mikroskopowymi, nasunęło mi się pytanie: czy nie



**byłoby wartościowym wykazanie testami in vitro bezpośrednich oddziaływań zmutowanych białek ParA (T3A itd.) z badanym białkiem wierzchołkowym DivIVA?**

Ostatni podrozdział Wyników (5.6) dotyczy wpływu mutacji T3A, znoszącej oddziaływanie białka ParA z DivIVA, na przeżywalność *M. smegmatis* w warunkach stresowych tj. głodzenie, wysuszenie, traktowanie kwasem naldyksynowym, którą oznaczano przez pomiar gęstości optycznej (OD) lub liczbę jednostek koloniotwórczych (CFU). Doktoranta zwraca uwagę na długi czas przeżywania prątków w analizowanych warunkach, jednocześnie zastosowane procedury nie do końca wyczerpująco zostały opisane, zwłaszcza dla warunków wysuszenia. **Poprosiłabym Doktorantkę o dokładniejsze wyjaśnienie tych eksperymentów, co wskazywało na fakt, iż komórki *Mycobacterium* uległy wysuszeniu?**

Należy nadmienić, że Doktorantka bardzo starannie zilustrowała przeprowadzone badania i włożyła mnóstwo pracy w analizy mutantów bakteryjnych, połączonych z analizą filmów poklatkowych, wykorzystując wysokorozdzielczą mikroskopię co pozwoliło na śledzenie w czasie zmian zachodzących w pojedynczych komórkach bakteryjnych. Warto zwrócić uwagę na dobrze dobrane układy kontrolne pozwalające na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków z przeprowadzanych badań. W tym miejscu pragnę podkreślić, iż przeprowadzone przez Doktorantkę badania zaowocowały publikacją w bardzo dobrym czasopiśmie *Molecular Microbiology*, o współczynniku IF 3,816.

Dyskusja pracy została podzielona na podrozdziały i zawiera przemyślane interpretacje uzyskanych wyników świadczące o znajomości badanej tematyki, umiejętności wyciągnięcia logicznych wniosków w oparciu o własne spostrzeżenia jak również dane literaturowe (95 pozycji literatury). Zwieńczeniem Dyskusji jest zaproponowany przez Panią mgr M. Pióro model oddziaływania białek ParA-DivIVA u *M. smegmatis*, który w sposób obrazowy wyjaśnia cykl komórkowy tych bakterii i jednocześnie stanowi zbiór wniosków płynących z przeprowadzonych badań.

W tekście rozprawy zauważono drobne błędy językowe i redakcyjne, a także zwroty żargonowe czy niepoprawne sformułowania, takie jak np.: *odporność na wysuszenie*, *poprawność kolonii*, *plazmidowe DNA*. Dodatkowo wkradł się błąd w numerowaniu Rysunków na str. 29, Rys. 2.9 został zacytowany dwukrotnie, zaś Rys. 2.6 (str. 23) nie powinien być cytowany na końcu zdania opisującego wpływ delekcji w genach *parA* i *parB* u *P. aeruginosa* na mobilność tych bakterii.

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

**- Jakie inne białka poza ParA i ParB mogą być zaangażowane w oddziaływanie z DivIVA u *Mycobacterium* lub regulować jego poziom w komórce?**



- Czy planują Państwo skonstruowanie mutanta warunkowego z obniżonym poziomem DivIVA? Jakie zmiany mogłyby zostać zaobserwowane w czasie cyklu komórkowego *Mycobacterium*?
- Z uwagi na fakt, iż DivIVA jest ważnym białkiem dla przeżywania prątków, czy uważa Pani że mogłyby być wykorzystane jako cel dla leków przeciwprątkowych?

**Podsumowanie:**

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Moniki Pióro uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki co wpływa na moją wysoką ocenę osiągnięć Pani mgr Moniki Pióro, a zawarte pytania, wątpliwości nie wpływają w najmniejszym stopniu na bardzo pozytywną ocenę pracy. Jednocześnie stwierdzam, że praca mgr Moniki Pióro w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk biologicznych i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN o dopuszczenie mgr M. Pióro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Pióro przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Anna Brzostek