INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI
POLSKA AKADEMIA NAUK
UL. PAWINSKIEGO 5A
02-106 WARSZAWA
https://ibb.edu.pl
Fax: (+48 22) 592 2190

Dr hab. Aneta Agnieszka Bartosik
Pracownia Mikrobiologii Molekularnej i Genetyki Bakterii
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
e-mail: anetab2@ibb.waw.pl
tel.: (+48 22) 592 1212

Warszawa 05.05.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Katarzyny Pawlikiewicz pt.
„Rola kondensyny SMC w organizacji chromosomu
Streptomyces venezuelae
podczas sporulacji i kiełkowania zarodników"

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pawlikiewicz stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod opieką naukową prof. dr hab. Dagmary Jakimowicz. Podjęta w pracy tematyka stanowi kontynuację ciekawego i ważnego z biologicznego punktu widzenia nurtu badań naukowych prowadzonych w grupie promotora pracy. Badania opisane w rozprawie doktorskiej finansowane były z grantu NCN Opus 16 (2018/31/B/NZ1/00614) zatytułowanego „Organizacja przestrzenna chromosomu podczas sporulacji *Streptomyces* - wpływ na podziały komórkowe, segregację chromosomów, przeżywalność i kiełkowanie zarodników". Doktorantka zaangażowana była w realizację zadań badawczych projektu korzystając z wiedzy i doświadczenia promotora, współpracowników oraz nowoczesnego zaplecza badawczego uczelni.

Organizmem modelowym w przedstawionej do recenzji pracy jest Gram-dodatnia bakteria *Streptomyces venezuelae*, mniej znana przedstawicielka rodzaju *Streptomyces* należącego do promieniowców. Bakterie z tego rodzaju produkują wiele naturalnych metabolitów wtórnych mających zastosowanie w przemyśle. Charakteryzują się złożonym cyklem życiowym, w którym występuje stadium wzrostu wegetatywnego z wytworzeniem wielogenomowych strzępek, oraz sporulacja z wytworzeniem jednogenomowych zarodników. Złożony cykl życiowy z tworzeniem form przetrwalnikowych wymaga koordynacji wielu procesów w komórkach bakterii, między

innymi tych zapewniających stabilne utrzymywanie i dziedziczenie materiału genetycznego. U większości bakterii, w tym u *Streptomyces*, białka ParA i ParB wraz z sekwencjami centromeropodobnymi *parS* biorą udział w segregacji chromosomów do komórek potomnych. Za upakowanie i kondensację DNA w bakteriach odpowiadają białka oddziałujące z DNA typu NAP oraz kondensyny reprezentowane przez białka SMC. Prace prowadzone w różnych zespołach badawczych pokazały, iż ParB bierze udział w rekrutacji kompleksów kondensyn SMC, co wspomaga kondensację DNA i zapewnia przestrzenną organizację chromosomu. Właściwa organizacja i rozdział powielonych, linowych chromosomów podczas sporulacji u *Streptomyces* są kluczowe dla zagwarantowania przekazania pełnego materiału genetycznego komórkom potomnym. Poznanie mechanizmów kontrolujących złożony cykl życiowy tych bakterii jest szczególnie ważne ze względu na ich zdolności do produkcji wielu cennych metabolitów mających zastosowanie w przemyśle.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Pawlikiewicz było zbadanie wpływu białka SMC na tworzone kompleksy ParB z DNA oraz określenie roli oddziaływań SMC/ParB/DNA w organizacji chromosomu *S. venezuelae* podczas sporulacji i kiełkowania zarodników. Przeprowadzone badania poszerzyły wiedzę na temat roli białek SMC, ParB i ich oddziaływań z DNA w prawidłowym przebiegu segregacji chromosomów *S. venezuelae,* jako bakterii o złożonym cyklu rozwojowym i przedstawiciela promieniowców.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Pawlikiewicz ma formę monografii liczącej 234 strony, napisanej w języku polskim, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, z podziałem na rozdziały charakterystyczne dla opracowań naukowych opartych o badania eksperymentalne: Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Bibliografia oraz Wykaz skrótów. Tytuł rozprawy doktorskiej oddaje poruszaną tematykę i odzwierciedla cele i zakres badań. Praca napisana jest klarownie, syntetycznie, stanowiąc bardzo ciekawą i wartościową lekturę.

Wstęp stanowi dobrze przemyślane wprowadzenie do tematyki podjętej w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej. Na 23 stronach, w zwięzły sposób Doktorantka opisała zagadnienia związane z organizacją chromosomu bakteryjnego w czasie cyklu komórkowego, mechanizmem działania białek ParB, SMC i ich roli w oddziaływaniach z DNA. Wstęp wzbogacono rysunkami przedstawiającymi schematy budowy i działania badanych białek, co ułatwia zrozumienie procesów, w które są zaangażowane. Osobny rozdział poświęcono charakterystyce bakterii z rodzaju *Streptomyces,* w szczególności ich cyklowi życiowemu i organizacji chromosomu w różnych fazach wzrostu.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka zawarła wszystkie niezbędne informacje na temat konstruktów, szczepów, buforów, podłoży, starterów, odczynników, enzymów, aparatury,

narzędzi bioinformatycznych wykorzystywanych w pracy, niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów i analiz. Co ważne, wykorzystywane do realizacji zadań badawczych metody mikrobiologiczne, genetyczne i molekularne zostały szczegółowo opisane, umożliwiając odtworzenie warunków eksperymentów. Osobny rozdział poświęcony został konstrukcji wektorów i szczepów wykorzystywanych w pracy wraz z załączonymi pomocnymi poglądowymi schematami. Warto podkreślić, że stosowane metody i techniki badawcze zostały dobrze przemyślane, umiejętnie zastosowane i świadczą o bardzo dobrym, nowoczesnym warsztacie metodycznym Doktorantki.

Wyniki rozprawy doktorskiej opisane zostały w 3 rozdziałach, z których każdy podzielony został na mniejsze podrozdziały systematyzujące poruszane kwestie. Wyłaniają się trzy główne nurty podjęte w pracy badawczej związane z określeniem: roli białka ParB w oddziaływaniach SMC-DNA; wpływu SMC na kompleksy ParB oraz wpływu SMC na organizację chromosomu podczas cyklu życiowego, w szczególności podczas kiełkowania zarodników *S. venezuelae*.

Eksperymenty z wykorzystaniem FLAG-SMC i immunoprecypitacji chromatyny wykazały ponad 4000 miejsc wiązania SMC w genomie S. *venezuelae*, w tym ponad 1500 wspólnych dla dwóch badanych punktów czasowych reprezentujących etapy różnicowania strzępki przed rozpoczęciem procesu kondensacji i segregacji chromosomów (godzina 11) oraz po rozdziale chromosomów (godzina 14). Pokazano, że SMC wiąże się z DNA już na wcześniejszym etapie różnicowania strzępki przed etapem kondensacji i segregacji chromosomów oddziałując równomierne wzdłuż chromosomu. W późniejszym etapie różnicowania i wzrostu SMC wiąże się preferencyjnie w centralnej części chromosomu obejmującej region *oriC*. Wykazano, że białko ParB jest wymagane do rekrutacji białka SMC do chromosomu *S. venezuelae* w późnym etapie różnicowania (14 godzina). Identyfikacja tak wielu miejsc wiązania SMC z DNA nasuwa pytanie o ilość białka w komórkach, która zapewnia tak liczne interakcje, zarówno białka SMC, jak i ParB oraz pytanie czy dostępność tych białek zmienia się w trakcie cyklu rozwojowego? W pracy przedstawiono wyniki analiz detekcji białek fuzyjnych ParB-HaloTag (s. 125) oraz FLAG-SMC (s. 167) potwierdzając podobny poziom białek w różnych punktach czasowych badanych szczepów. Brak SMC nie wpływał na poziom białka ParB w badanych warunkach - hodowle od 14 godziny (Rys. 5.6; 5.7). Nasuwa się jednak pytanie o godziny wcześniejsze, szczególnie w kontekście określenia wpływu ParB na oddziaływanie SMC z DNA w przedstawionych wynikach z analiz ChIP-seq z hodowli 11-godzinnych (Rys. 5.2).

Wykorzystanie *S. venezuelae* jako organizmu modelowego umożliwiło zbadanie lokalizacji i dynamiki tworzonych kompleksów ParB w strzępkach sporogennych w hodowlach płynnych w czasie rzeczywistym. Warto podkreślić, że były to pierwsze takie obserwacje z udziałem przedstawiciela *Streptomyces*, gdyż wcześniejsze badania ParB w czasie rzeczywistym prowadzone

były w *S. coelicolor* i skupiały się na wzroście wegetatywnym. Do analiz wykorzystano szczep *S. venezuelae* produkujący ParB-HaloTag pod kontrolą promotora indukowanego i dodatkowo produkującego FtsZ-YPet jako marker podziału. Zaobserwowano nieregularnie rozmieszczone kompleksy ParB-HaloTag widoczne podczas wydłużania strzępek sporogennych, z jasnym skupiskiem na wierzchołku strzępki. Po zatrzymaniu wydłużania się strzępek obserwowano równomiernie rozłożone kompleksy ParB-HaloTag i pojawienie się regularnie rozmieszczonych pierścieni FtsZ. Kompleksy ParB oraz pierścienie FtsZ stopniowo zanikały, aż do całkowitego rozpadu przed etapem wytworzenia zarodników.

W dalszym etapie sprawdzano czy obecność SMC wpływa na rozmieszczenie lub czas życia kompleksów ParB w czasie wydłużania strzępki i po zatrzymaniu jej wzrostu. Wykazano, że brak SMC nie wpływa na rozmieszczenie kompleksów ParB podczas wydłużania się strzępki sporogennej. Natomiast na etapie segregacji chromosomów brak SMC nieznacznie skracał dystans pomiędzy kompleksami ParB. Zaobserwowano także, że w szczepie pozbawionym SMC regularnie rozmieszczone kompleksy ParB-HaloTag pojawiały się szybciej niż w szczepie kontrolnym i rozpadały się wcześniej. Skrócił się także czas od zatrzymania wzrostu do wykrycia zarodników w szczepie Δ*smc*. Analizy podziałów komórkowych wykazały natomiast, że usunięcie SMC nieznacznie opóźniło moment wytworzenia przegród poprzecznych w strzępkach sporogennych. Uzyskane wyniki wskazują, że eliminacja SMC przyśpiesza demontaż kompleksów ParB-Halotag w komórkach sporogennych oraz wpływa na podziały komórkowe.

W badaniach kompleksów ParB wykorzystano metodę śledzenia ruchliwości pojedynczych cząsteczek białka (SPT, ang. *Single Particle Tracking*) i mikroskopię wysokorozdzielczą. Wykazano, że brak SMC nie wpłynął na ruchliwość cząsteczek ParB-HaloTag na wczesnym etapie rozwoju strzępek (17 godzina wzrostu) oraz w sporach w porównaniu do szczepu kontrolnego. Natomiast w strzępkach na późniejszym etapie różnicowania (22 godzina wzrostu) frakcja nieruchomych cząsteczek ParB-HaloTag w szczepie z delecją genu *smc* była o ponad 20 % większa niż w szczepie kontrolnym. Nie było to spowodowane opóźnieniem w sporulacji, gdyż sprawdzono różnicowanie szczepu kontrolnego i Δ*smc* w hodowli płynnej, wykazując, iż w 22 godzinie rozwoju strzępki, frakcja strzępek zawierających kompleksy ParB-HaloTag w szczepie bez SMC, była tylko nieznacznie wyższa niż w szczepie kontrolnym. Większa różnica w porównywanym parametrze widoczna była w 28 godzinie różnicowania strzępki (Rys. 5.19B). Czym można ją wytłumaczyć i czy jest istotna statystycznie?

Sprawdzono także wydajność replikacji chromosomów wykorzystując technikę qPCR i analizę częstości markerów regionu *oriC* i ramion (*ori:arm*) wyznaczając ich stosunek podczas rozwoju sporogennego w hodowlach 16 – 28 godzinnych szczepów kontrolnego i Δ*smc*. Nie zaobserwowano istotnej różnicy w szybkości replikacji chromosomów między badanymi

szczepami. Analizowane parametry nie wyjaśniały zmniejszonej ruchliwość cząsteczek ParB w szczepie Δ*smc* w 22 godzinie hodowli strzępek sporogennych.

Zbadano także ruchliwość pojedynczych cząsteczek ParB podczas wczesnej fazy wzrostu wegetatywnego *S. venezuelae* (5 godzina hodowli), analizując ruchliwość ParB-HaloTag w wierzchołkowym kompleksie ParB. W młodych komórkach wegetatywnych, podobnie jak w późnych komórkach sporogennych, brak SMC znacząco zmniejszył ruchliwość ParB-HaloTag, co sugerowało obniżoną dynamikę ParB na biegunach komórek wegetatywnych. Pokazano także, iż w szczepie Δ*smc* nieruchome cząsteczki ParB-HaloTag były bardziej rozproszone.

Wykorzystano technikę FRAP i mikroskopię konfokalną, aby zbadać, czy białko SMC wpływa na dynamikę wierzchołkowego kompleksu ParB-HaloTag. Przeprowadzone analizy wykazały zwiększoną dynamikę kompleksu ParB-HaloTag w szczepie Δ*smc*, co sugeruje większą dostępność cząsteczek ParB do odbudowy kompleksu wierzchołkowego.

W kolejnym etapie pracy badano wpływ SMC na oddziaływanie białka ParB z DNA w szczepie dzikim oraz Δ*smc* w młodych komórkach wegetatywnych *S. venezuelae* (5 godzina wzrostu) wykorzystując technikę immunoprecypitacji chromatyny z przeciwciałami anty-ParB. Zidentyfikowano 483 miejsca wiązania ParB do DNA w szczepie dzikim i 3789 w szczepie pozbawionym SMC. W szczepie Δ*smc* zaobserwowano dwukrotnie niższą liczbę odczytów w obszarze sekwencji *parS* w porównaniu do szczepu dzikiego, co sugerowało słabsze wiązanie ParB do *parS*. Jednocześnie brak SMC wyeliminował wiązanie ParB do sekwencji sąsiadujących z miejscami *parS*. Analiza nieswoistego wiązania ParB wykazała zwiększoną asocjację ParB z DNA w całej centralnej części chromosomu w szczepie Δ*smc*. Zaobserwowane zależności pomogły wyjaśnić wpływ SMC na dynamikę kompleksu ParB i ruchliwość cząsteczek ParB.

W ramach pracy doktorskiej zbadano także wpływ SMC na aktywność hydrolityczną CTP białka ParB *S. venezuelae*. Potwierdzono, że ParB wykazuje aktywność CTPazową stymulowaną oddziaływaniem ParB z sekwencją *parS*. Obecność SMC hamowała aktywność CTPazową ParB w obecności DNA z *parS*. Zależności te tłumaczą zwiększone wiązanie ParB do DNA oraz jego rozprzestrzenianie się poza *parS* w obecności SMC, gdyż aktywność CTPazowa wiąże się ze zwolnieniem ParB z DNA.

Ponieważ brak SMC powodował zaburzenia organizacji chromosomu i jego upakowania do zarodników przeprowadzono także badania wpływu SMC na organizację chromosomu podczas kiełkowania zarodników *S. venezeuelae,* a także na wzrost strzępek wegetatywnych w pierwszych godzinach ich wydłużania. Zaobserwowano, że brak białka SMC przyśpiesza kiełkowanie spor.

Zastosowanie techniki FROS z operatorami *tetO* i białkiem TetR-mVenus, fuzji ParB-HaloTag oraz DnaN-EGFP pozwoliło na śledzenie lokalizacji regionu *oriC*, kompleksów ParB oraz procesu replikacji chromosomu podczas kiełkowania zarodników *S. venezeuelae*. W szczepie Δ*smc* pierwszy kompleks FROS-52, ParB-HaloTag oraz DnaN-EGFP w nowo powstałej strzępce pojawiały się później w porównaniu ze szczepem kontrolnym. Jednak długość strzępki w momencie pojawienia się kompleksów była porównywalna w szczepie kontrolnym i Δ*smc*, co sugeruje wolniejsze wydłużanie się strzępek pod nieobecność SMC. Badania przyrostu długości strzępki potwierdziły, iż SMC może mieć wpływ na szybkość wydłużania nowo powstałej strzępki i proces kiełkowania.

Wykazano wyższy stosunek *oriC:arm* pomiędzy szczepem typu dzikiego a Δ*smc* podczas rozwoju wegetatywnego *S. venezeuelae*. Sugerowało to różnice w przebiegu replikacji chromosomów, lecz wykluczono nadmierną replikację w szczepie pozbawionym SMC. Badania wpływu SMC na lokalizację *oriC* w młodych strzępkach wegetatywnych wykazały natomiast zwiększoną odległość kompleksów FROS oraz ParB-HaloTag od wierzchołka strzępki w szczepie Δ*smc* w porównaniu ze szczepem kontrolnym. Analizy FROS sugerowały także zaburzoną organizację chromosomu w pobliżu regionu *oriC* w szczepach Δ*smc*. Wykazano, że szczepy bez SMC charakteryzowały się zwiększoną odległością regionu *oriC* od krawędzi nukleoidu.

W recenzowanej pracy doktorskiej wykorzystując *S. venezeuelae* jako organizm modelowy, który umożliwia śledzenie złożonego cyklu życiowego w hodowlach płynnych, w konsekwentny i logiczny sposób przedstawiono charakterystykę oddziaływania białka SMC z DNA i ich wpływu na organizację chromosomu podczas cyklu życiowego, w tym podczas kiełkowania zarodników *S. venezuelae*, a także wpływu delecji *smc* na tworzenie kompleksów ParB i organizację chromosomu w regionie *oriC* w strzępkach wegetatywnych.

Na stawiane pytania i cele Doktorantka systematycznie odpowiadała dobrze zaplanowanymi i zrealizowanymi badaniami *in vivo* i *in vitro*, których wyniki pozwoliły uzyskać osiągnięcie postawionych celów. Mimo ogromnej ilości materiału do przedstawienia i przedyskutowania, lektura rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Pawlikiewicz była przyjemnością ze względu na klarowne i syntetyczne opracowanie wyników, bardzo dobry wybór schematów, wykresów i zdjęć obrazujących najważniejsze rezultaty badań znacząco ułatwiających ich analizę i percepcję. Dobrano stosowne analizy statystyczne, ilość powtórzeń eksperymentów czy odpowiednie kontrole umożliwiające wysunięcie prawidłowych wniosków. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały także znakomicie przedyskutowane w oparciu o aktualny stan wiedzy, w odniesieniu do najnowszych osiągnięć i badań w poruszanej tematyce w rozdziale Dyskusja. Dyskusja podzielona została na podrozdziały, które dedykowane są systematycznemu podsumowaniu i umówieniu uzyskanych wyników w kontekście doniesień literaturowych. Zadbano o odpowiedni dobór

cytowanej literatury. Co ważne podnoszone w dyskusji kwestie sugerują także dalsze kierunki badań, które mogą być podjęte w celu lepszego zrozumienia przedstawianych kwestii w kontekście złożonego cyklu życiowego *S. venezeuelae* i roli białek SMC, ParB i ich oddziaływań z DNA.

W osobnym rozdziale „Podsumowanie" wypunktowano najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu doktorskiego, a ich dogłębna analiza w odniesieniu także do doniesień literaturowych umożliwiła zaproponowanie modelu pozytywnego sprzężenia zwrotnego ładowania SMC na kompleks ParB, a także modelu obrazującego wpływ SMC na organizację regionu *oriC* w chromosomie w strzępce wegetatywnej *S. venezuelae.*

Uzyskane wyniki w recenzowanej rozprawie doktorskiej dostarczają kluczowych informacji na temat tworzenia kompleksu ParB z DNA i jego współdziałania z SMC u *S. venezuelae*. Po raz pierwszy opisano jak SMC wpływa na kompleksy ParB i ich stabilność. W kontekście złożonego cyklu życiowego *Streptomyces* pokazano również wpływ SMC na organizację regionu *oriC* w chromosomie w strzępkach wegetatywnych, na migrację chromosomu ze spory do powstającej podczas kiełkowania strzępki oraz na przebieg replikacji chromosomów u *S. venezuelae*.

Opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki zawarte zostały w dwóch publikacjach: Szafran et al., 2021 oraz Pawlikiewicz et al., 2025, z których druga, w której Doktorantka jest pierwszym autorem została wysłana do recenzji.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych nieścisłości, braków, niedociągnięć językowych, literowych, stylistycznych, nomenklaturowych, edytorskich, itp.:

- **s. 46**, Tabela 4.2 – opis szczepów z fuzją *flag-smc* – dla szczepu TM019 *smc-flag* w opisie, podobnie s. 167; zamiennie pojawia się FLAG-SMC i SMC-FLAG i dalej str. 168 opis szczepu TM019; podobnie w opisie np. Rys. 5.27, s. 165; s. 168; s. 188; s. 208;
- **s. 116** – na rys. 5.2 warto byłoby oznaczyć pozycję regionu *oriC*;
- **s. 120, 121** – dwukrotnie „KP009, KP009 oraz KP010" zamiast „KP008, KP009 oraz KP010";
- **s.122**, opis Rys.5.5 – w opisie ścieżek widnieje MD020 jako ΔparB szczep, a w opisie figury MD030?
- **s.127** - błędne odwołanie do Tabeli 4.5.2.1, powinno być Tabela 4.11;
- gdzieniegdzie w pracy występują literówki, błędy gramatyczne i wynikające z nich błędy stylistyczne.

Należy jednak podkreślić, że wypunktowane niedociągnięcia, braki, błędy nie umniejszają bardzo wysokiej, zdecydowanie pozytywnej ocenie rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników przez Panią mgr Katarzynę Pawlikiewicz.

Mam kilka pytań, kwestii, które nasunęły się po lekturze tej rozprawy, które zamieszczam poniżej, prosząc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony:

1/ Czy można przewidzieć czy białko ParB będzie niezbędne do oddziaływania SMC z DNA w punkcie czasowym 11 godzin, reprezentującym etap wzrostu przed kondensacją i rozdziałem chromosomów? Dlaczego nie badano poziomu białka ParB-HaloTag w pkt. czasowym 11 godzin wzrostu?

2/ Czy badano jaki jest poziom ekspresji *smc* (*flag-smc?*) w szczepie Δ*parB S. venezuelae?*

3/ Komplementacja szczepu Δ*smc* w szczepie TM019 z wykorzystaniem fuzji *smc-flag* (tak zapisano w opisach figur np. Rys. 5.29, 5.43, ale czy nie powinno być *flag-smc*) nie prowadziła do pełnego odtworzenia cech szczepu dzikiego. Czym można to wytłumaczyć? Poproszę o komentarz. W pracy pojawiają się w opisach nazwy FLAG-SMC, jak i SMC-FLAG stosowane zamiennie dla opisania fuzji produkowanej w szczepie TM019, np. Rys. 5.28. Dołączenie znacznika do N- lub C-końca białka może mieć wpływ na jego funkcjonowanie. Doprecyzowanie jaką fuzję wykorzystywano w badaniach jest tym samym kluczowe dla interpretacji wyników badań.

4/ Nawiązując do poprzedniego zagadnienia dlaczego zdecydowano się wykorzystać fuzję FLAG-SMC, a nie SMC-FLAG w prowadzonych badaniach?

5/ W jakich punktach czasowych hodowli zbierano materiał do analiz przedstawionych na Rys. 5.3; 5.4; 5.5? Jak wyjaśnić niższy poziom detekcji ParB-HaloTag w szczepie KP007 w porównaniu z WT, obecność dzikiej formy ParB w szczepie KP006 oraz niższy poziom detekcji ParB w szczepie TM010 w porównaniu z WT na Rys. 5.3A?

5/ Przeprowadzone analizy wskazują na podobne tempo wzrostu i różnicowania większości szczepów wykorzystywanych w pracy, jedynie szczepy pozbawione *smc* (TM010, KP007) rosły nieznacznie szybciej w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Jak to można wytłumaczyć?

6/ W szczepie pozbawionym SMC regularnie rozmieszczone kompleksy ParB-HaloTag pojawiały się szybciej niż w szczepie kontrolnym i rozpadały się wcześniej. Skrócił się także czas od zatrzymania wzrostu do wykrycia zarodników w szczepie Δ*smc*. Nasuwa się pytanie czy nie należy odnieść tego faktu do tempa wzrostu badanych szczepów, które jak zaobserwowano (Rys. 5.17) było szybsze dla szczepu Δ*smc* w porównaniu ze szczepem kontrolnym?

7/ Czy istnieje biologiczne, funkcjonalne wyjaśnienie dlaczego nie udało się skonstruować szczepu produkującego białko FtsZ-YPet oraz ParB-HaloTag pod kontrolą natywnych promotorów?

8/ Czy rozważano skonstruowanie szczepu *S. venezuelae* produkującego wyznakowane białka ParB, SMC, FtsZ (np. FtsZ-YPet, ParB-HaloTag, mVenus-SMC lub wykorzystując inne znaczniki), by śledzić jednocześnie ich lokalizację w trakcie cyklu życiowego bakterii?

Podsumowując, warto podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną wyników prezentowanych w pracy. Kluczowe dla osiągnięcia postawionego na wstępie celu było zastosowanie przez Doktorantkę różnych, nowoczesnych podejść eksperymentalnych. Uzyskane

wyniki ujawniają zaangażowanie, samodzielność i dużą wiedzę Doktorantki, tak w zakresie poruszanych zagadnień naukowych, jak i stosowanych metod, co potwierdza umiejętności i gotowość Pani mgr Katarzyny Pawlikiewicz do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienia badawcze i uzyskane oryginalne wyniki charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi, naukowymi, także o możliwym znaczeniu aplikacyjnym.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej ustawie (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Z pełnym przekonaniem i poparciem zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Pawlikiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy prezentowanej rozprawy, zastosowane różnorodne, nowoczesne metody oraz poznawcze i potencjalnie praktyczne znaczenie przedstawionych wyników, a także fakt, iż stanowią one podstawę dwóch niezależnych manuskryptów, wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.

Signed by / Podpisano przez:

Aneta Agnieszka Bartosik
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Date / Data: 2025-05-05 16:14

Dr hab. Aneta Bartosik