



**INSTITUTE OF
BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS**
POLISH ACADEMY
OF SCIENCES

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Prof.dr hab. Iwona Fijałkowska

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 07.09.2022

Recenzja pracy doktorskiej Pani Małgorzaty Płachetki pt. „Mechanizmy inicjacji replikacji chromosomu *Streptomyces*”.

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej oraz promotora pomocniczego Pana dr Marcina Wolańskiego. W skład pracy doktorskiej wchodzi dwie publikacje oryginalne oraz praca przeglądowa. Dołączone publikacje wraz materiałami uzupełniającymi poprzedzone są krótkim wprowadzeniem. I tu już na wstępie chciałabym pochwalić Doktorantkę, która w sposób jasny, zwięzły, a jednocześnie wyczerpujący, bez podawania zbędnych danych, wprowadza czytelnika w tematykę i wyniki prezentowanej pracy doktorskiej.

Adaptacja bakterii do różnych warunków środowiska wymaga kontroli replikacji DNA, regulacji syntezy ściany komórkowej, podziału komórki, kształtu komórki czy właściwości otoczki komórkowej. *Streptomyces*, należące do rodzaju Gram-dodatnich *Actinobacteria*, zawierają w swoim genomie wiele genów kodujących metabolity wtórne, substancje przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe czy immunosupresyjne. Dlatego też *Streptomyces* są przedmiotem intensywnych prac badawczych.

Mechanizmy inicjacji *Streptomyces* są przedmiotem pierwszej publikacji włączonej do pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Płachetki. Praca pt. „*Streptomyces* origin of chromosomal replication with two putative unwinding elements” została opublikowana w 2019 roku w *Microbiology*. Jest to praca wieloautorska, jednak Doktorantka jest tu pierwszą autorką, której udział został określony na 68%.

W prezentowanej pracy autorzy przy użyciu metod footprintingu analizowali *in vitro* cały region sekwencji *oriC* *Streptomyces*. Badania te pozwoliły na wyznaczenie rejonów wiążących białko inicjatorowe DnaA, o sekwencji konsensowej 5'-TT[G/C]TCCACA-3'. Następnie analizując *in silico* regiony *oriC* z kilku gatunków *Streptomyces*, używając algorytmu WebSIDD (stress-induced DNA duplex destabilization), pozwalającego na wyznaczenie potencjalnie niestabilnych, mogących ulec rozpleceniu sekwencji DNA wyznaczono dwa miejsca (DUE 1 i DUE 2), w których może nastąpić rozpoczęcie formowania kompleksu replikacyjnego. Natomiast, przy użyciu nukleazy P1 przeprowadzono analizy *in vitro* regionu *oriC* *S. coelicolor* sprawdzając czy te rejony zdolne są do rozplecenia DNA w obecności białka DnaA. Badanie te sugerowało, że rozwijanie DNA może zachodzić w obrębie obu rejonów. *S. coelicolor* sporuluje tylko na podłożu stałym, co ogranicza wybranie odpowiedniej metody badania. Autorzy postanowili przeprowadzić mapowania RIP (replication initiation point mapping) *in vivo* z wykorzystaniem *S. venezuelae*, ponieważ gatunek ten przechodzi cały cykl życiowy w płynnej pożywce i charakteryzuje się homogenicznym wzrostem w hodowli. Badanie RIP przeprowadzone w szczepach z temperaturowrażliwym białkiem DnaATs wskazało DUE2 jako miejsce startu replikacji. Jednakże, autorzy pracy biorą pod wagę fakt, że aktywność transkrypcyjna sąsiednich genów może mieć znaczenie w aktywacji drugiego miejsca rozplecenia DNA DUE1 w zależności od fazy wzrostu. Czy prowadzone były badania sprawdzające tę hipotezę?

Pytanie, gwoli zaspokojenia ciekawości recenzentki: czy zróżnicowanie budowy, aranżacji miejsc startu replikacji w różnych gatunkach bakterii może powodować różnice w strategiach regulacyjnych tj. wykorzystanie DnaA-ATP czy DnaA-ADP w kontroli formowania orisomów?

Jak już wspomniano, ważną cechą *Streptomyces* jest zdolność do wytwarzania niezliczonej ilości metabolitów wtórnych. Poszukiwanie, identyfikacja i modyfikacja zespołów genów odpowiedzialnych za biosyntezę tych metabolitów, a także określenie transkrypcyjnej/translacyjnej regulacji takich zespołów genów jest przedmiotem wielu badań. AdpA jest kluczowym regulatorem kontrolującym zarówno metabolizm wtórny jak i zróżnicowanie morfologiczne w *Streptomyces*. Wykazano, że ekspresja *adpA* podlega wielopoziomowej regulacji na poziomie transkrypcyjnym,

potranskrypcyjnym i translacyjnym. Dopiero ostatnie lata przyniosły pewne dane wskazujące na regulację potranslacyjną AdpA.

W drugiej publikacji zatytuowanej "AdpA Positively Regulates Morphological Differentiation and Chloramphenicol Biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*", opublikowanej w 2021 roku w *Microbiology Spectrum* Doktorantka również jest pierwszą autorką, której udział w powstawaniu pracy został określony na 55%. W tej pracy po raz pierwszy opisano badania roli czynnika transkrypcyjnego AdpA w morfologicznym różnicowaniu autoregulacji transkrypcji własnego genu i biosyntezie chloramfenikolu w *Streptomyces venezuelae*, który został ustanowiony jako model do badań rozwojowych w *Streptomyces*. Wykazano, że AdpASv wykazuje wysoki stopień podobieństwa do innych odpowiedników AdpA zarówno na poziomie aminokwasów, jak i organizacji domen. Obserwacje fenotypowe *S. venezuelae* na stałych podłożach hodowlanych wykazały, że AdpASv jest wymagany do rozwoju nadziemnych strzępek i tworzenia zarodników, a więc wpływa na zróżnicowanie morfologiczne, podobnie jak w przypadku innych *Streptomyces*.

Aby ocenić czy AdpASv oddziałuje z regionem promotora własnego genu i wpływa na jego aktywność przeanalizowano *in silico* organizację miejsc wiążących AdpA w regionach promotorowych *adpA* z trzech gatunków - *S. venezuelae*, *S. coelicolor* i *S. griseus*. Zbadano interakcje AdpA-promotor *in vitro* za pomocą testu elektroforetycznego (EMSA) oraz *in vivo* za pomocą immunoprecypitacji chromatyny połączonej z qPCR (ChIP-qPCR). Wyniki pokazały specyficzne oddziaływanie białka AdpA z promotorem *adpA*. Zbadano również zdolność AdpASv do transkrypcyjnej regulacji własnego genu. Otrzymane wyniki upoważniają do wnioskowania, że AdpASv pozytywnie autoreguje aktywność promotora genu *adpASv*.

Chciałabym zapytać, czy AdpA może negatywnie regulować zróżnicowanie morfologiczne w *Streptomyces*?

Badania prowadzone w innych *Streptomyces* wskazywały, że AdpA może być zaangażowany w regulację replikacji chromosomu. Jednakże, brak oddziaływania *in vivo* z rejonem *oriCSv* nie wskazuje na udział AdpA w regulacji replikacji chromosomów na etapie inicjacji. Autorzy dyskutują jednak możliwość oddziaływania z *oriCSv* w innych warunkach środowiskowych. Przeszukiwanie *in silico* sekwencji genomu *S. venezuelae* przy użyciu sekwencji konsensowej AdpASg(*S. griseus*), 5'-TGGCSNGWWY-3', umożliwiło identyfikację potencjalnych miejsc wiązania AdpA w

regionach promotorowych kilku genów związanych z biosyntezą chloramfenikolu. Za pomocą metody dyfuzyjnej Kirby-Bauera, porównując produkcję chloramfenikolu w szczepach typu dzikiego i mutantach z delecją *adpA*, po zbadaniu antybiotycznych właściwości ekstraktu pochodzącego mutanta $\Delta adpA$ wykazano, że *adpASv* jest niezbędny do biosyntezy chloramfenikolu u *S. venezuelae*.

W Dyskusji pracy analizując zmiany w poziomach *AdpASv* podczas cyklu komórkowego czy rozbieżność między poziomem transkryptu i białka, autorzy przedstawiają bardzo interesującą i nowatorską hipotezę zakładającą, że *AdpA* ulega regulacji potranslacyjnej, w tym wypadku wydajnej proteolizie, „która zmienia interakcję z DNA umożliwiając mechanizm regulacji ekspresji genów zależnych od *AdpA*, w tym jego własnego genu”.

Trudno nie zadać pytania, czy dostępne są jakieś nowe wyniki potwierdzające tę hipotezę? Czy można przytoczyć inne dane literaturowe wskazujące na potranslacyjną modyfikację *AdpA* w komórkach *Streptomyces*?

Nieco futurystycznie pytanie, czy planując w *Streptomyces* określony układ miejsc w DNA wiążących *AdpA* można wpłynąć na pojawienie się wymaganych cech, aktywację lub hamowanie określonych szlaków metabolicznych?

Trzecia praca wchodząca w skład pracy doktorskiej to praca przeglądowa pt. „Struktura chromosomu bakteryjnego – metody analizy oddziaływań białko – DNA *in vivo*” opublikowana w 2017 roku w Postępkach Higieny i Medycyny Doświadczalnej. Praca ma dwie autorki, których wkład jest równocenny. W pracy tej w bardzo przejrzysty i wyczerpujący sposób opisane są różne metody analizy chromosomu bakteryjnego. Metody ilustrowane są przejrzystymi rysunkami.

Podsumowując, dorobek Pani Małgorzaty Płachetki świadczy o dużej dojrzałości naukowej, znajomości wielu metod z zakresu genetyki, biochemii czy biologii molekularnej. Prezentowane wyniki są znakomitym punktem startowym do dalszych badań *Streptomyces*.

Praca ta spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie przez autorkę zagadnienia naukowego, wykazuje jej ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej, Nauki Biologiczne, Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu

Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Płachetki do dalszych etapów
przewodu doktorskiego.


Iwona J. Fijałkowska

1900

1900