



prof. dr hab. Grażyna Jagura-Burdzy
Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa
ul. Pawińskiego 5A

Warszawa 25.11.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Donczew pt” Analiza dynamiki wzrostu, różnicowania i segregacji chromosomów u *Streptomyces venezuelae*”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Donczew wykonana została pod kierownictwem dr hab. Dagmary Jakimowicz w zespole prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Zespół ten od wielu lat zajmuje się zagadnieniami replikacji DNA i segregacji chromosomów oraz koordynacją tych procesów głównie u promieniowców, *Streptomyces coelicolor* czy *Mycobacterium* sp. publikując wyniki swoich badań w prestiżowych międzynarodowych czasopismach naukowych. Oznacza to, że doktorantka realizowała swój projekt w doskonałym środowisku naukowym.

Projekt miał na celu zbadanie wpływu dwóch białek segregacyjnych ParA i ParB oraz topoizomerazy I na dynamikę wzrostu i różnicowania się strzępek nowego organizmu modelowego *Streptomyces venezuelae*. Wybór tego organizmu spowodowany był możliwością śledzenia rozwoju strzępek na wszystkich etapach różnicowania (w przeciwieństwie do *S. coelicolor* gatunek ten sporuluje na podłożu stałym bez konieczności kontaktu grzybni z powietrzem a także w podłożu płynnym). Doktorantka do realizacji postawionych celów mogła więc wykorzystać technikę zdjęć poklatkowych (time-lapse fluorescence microscopy) oraz przygotować próby do analizy ChIP-seq w fazie sporulacji. Obserwacje mikroskopowe w czasie pozwoliły na określenie czasu wzrostu strzępek od momentu powstania odgałęzienie do zatrzymania wzrostu, długości strzępek, czasu sporulacji, w tym czasu dojrzewania spor. Wyznaczano długości kompartmentów dla nowo tworzących się spor i badano obecność prespor bez DNA. Przy użyciu szczepów kodujących białko hybrydowe FtsZ-YPet wyznaczano czas i intensywność tworzących się pierścieni Z w czasie sporulacji, długość ich trwania. Podobne analizy przeprowadzono dla szczepów pozbawionych genów *parA*, *parB* czy z tzw deplecją TopA (delecja genu *topA* była letalna). Podjęto też próby wizualizacji białek ParA i ParB w fuzjach z EGFP zarówno w szczepie

dzikiem jak też z obniżoną ekspresją *topA*. Wyniki tych kompleksowych badań przedstawione w rozprawie są bardzo interesujące i niewątpliwie staną się podstawą do dalszych analiz tego organizmu.

Część szczegółowa recenzji

Praca ma klasyczny układ, tekst podzielony jest na typowe części uzupełnione kilkoma załącznikami, wśród nich załącznikiem elektronicznym z dokumentacją filmową mikroskopowych obserwacji przyżyciowych.

Wstęp poświęcony jest zagadnieniu organizacji/topologii, replikacji i segregacji chromosomów oraz podziałów komórkowych bakterii i na tym tle przedstawieniu *Streptomyces coelicolor* jako dotychczas najlepiej poznanego modelowego organizmu wśród promieniowców. Wstęp zakończony jest wskazaniem zalet nowego obiektu badań, którym zajmowała się doktorantka, czyli *S. venezuelae*.

Wstęp jest bardzo ogólnikowy, w moim odczuciu popularnonaukowy a nie naukowy. Próba „wrzucenia do jednego worka” danych dla różnych bakterii, o których wiadomo, że różnią się organizacją genomów, lokalizacją replisomów, przebiegiem replikacji, procesami segregacji, cyklem życiowym, morfogenezą, sprzyjało licznym nieścisłościom. Załączam kilka przykładów: „Krótco po inicjacji replikacji rozpoczyna się proces segregacji chromosomów” str 23 (**a jak jest u *E. coli*?**), u *Caulobacter crescentus* „przed rozpoczęciem replikacji *oriC* lokalizuje się specyficznie przy jednym z biegunów komórki - przyszłym biegunie komórki osiadłej” str 23 (to **również obecny biegun!**), „chromosomalne białka ParA należą do typu I białek segregacyjnych, podczas gdy białka typu II i III uczestniczą w segregacji DNA plazmidowego” str 25, (**białka typu I to najpowszechniej wykorzystywane białka w partycji plazmidów niskokopijnych i dzięki tym badaniom tak dobrze poznane**).

Wiele nieścisłości wkradło się również na etapie interpretacji przytaczanych prac np. „u *B. subtilis* zidentyfikowano 10 takich miejsc (*parS*), z czego badaniami *in vivo* potwierdzono wiązanie białka Spo0J do 8 z nich” str 26 (**cytowana praca Breiera i Grossmana z 2007 potwierdza wiązanie do 10 miejsc *in vivo***), „Dimeryzacja domen N-końcowych Spo0J (ParB) z *Thermus thermophilus*, (Leonard et al., 2004) jest niezbędna do związania DNA” str 27 (**główne domeny dimeryzacyjne to domeny C-końcowe, które są absolutnie potrzebne do wiązania *parS*, ze względu na ruchomy łącznik między N- i C-domeną nikomu do tej pory nie udało się wykrystalizować całych białek ParB, autorzy krystalizowali tylko domenę N-terminalną dodatkowo obcięta z N-końca i zidentyfikowana przez nich potencjalna płaszczyzna interakcji monomerów Spo0J odpowiada domenie polimeryzacyjnej scharakteryzowanej w pracy Kusiak et al 2011**). Również z pracy cytowanej Graham et al., 2014 i nie cytowanej Broderesz et al., 2014 wynika, że oprócz dimeryzacji (interakcje C-domen), polimeryzacji na DNA (interakcje między sąsiadującymi dimerami przy udziale domeny polimeryzacyjnej w N-końcu) dodatkowo postulowane jest oddziaływanie na dystans między tetramerami tzw

bridging/looping, nie jest to „inny mechanizm warunkujący powstanie segrosomu” a raczej rozszerzenie istniejącej teorii o potencjalną trzecią domenę/płaszczyznę interakcji.

Efekt mutacji *parAB* w *P. putida* jest zależny od fazy wzrostu, cytowana liczba 10% komerek (str 28) bez DNA (anucleate) dotyczy wejścia w fazę stacjonarną, w fazie aktywnego wzrostu nie ma wpływu na tempo wzrostu czy segregację chromosomów w przeciwieństwie do *P. aeruginosa*. Należałoby to uściślić podkreślając różnice gatunkowe. Warto byłoby również wspomnieć o postulowanych rolach regulatorowych białek ParB i zdecydowanie rozszerzyć informacje o najlepiej poznanym systemie ParAB u *Caulobacter crescentus*, jego udziale w kontroli cyklu komórkowego.

Podsumowując, podjęty we Wstępie temat został zbyt szeroko potraktowany co w efekcie dało bardzo powierzchowne i nieprecyzyjne informacje, może należałoby się skupić na szczegółowym przedstawieniu uzyskanych dotychczas wyników badania mechanizmu replikacji, segregacji chromosomów, roli kondensacji DNA dla *Actinomycetes* i na tym tle omówić ewentualne różnice między *Actinomycetes* a innymi gatunkami bakterii. **Chciałabym usłyszeć od doktorantki o różnicach w organizacji topologicznej genomów i roli topoizomeraz i białek SMC w komórkach różnych gatunkach bakterii, oczywiście w ujęciu syntetycznym.**

Rozdział **Materiały i Metody** jest najdłuższym rozdziałem (75 stron). Myślę, że z powodzeniem można było uniknąć powtarzania graficznych identycznych schematów przebiegu konstrukcji mutantów chromosomalnych. W testach weryfikacji uzyskanych szczepów zwraca uwagę brak specyficzności przeciwciał anti-ParB (uzyskanych dla ParB z *S. coelicolor* a stosowanych do detekcji ParB z *S. venezuelae*) mimo oczyszczania przeciwciał na kolumnach z ParB (rozumiem, że z *S. venezuelae*?). Na stronie 113 doktorantka opisując wyniki RT-PCR (rys 4.14) konkluduje: „W przypadku szczepu pozbawionego chromosomalnego genu *parA* poziom białka ParB jest porównywalny z poziomem ze szczepu dzikiego natomiast w MD004 *parA-egfp* poziom ParB jest niższy ale jedynie w trakcie początkowego etapu sporulacji. Co ciekawe zaobserwowano że ilość białka fuzyjnego ParB-EGFP w szczepie MD050 *parB-egfp* jest znacząco wyższa od poziomu białka ParB w szczepie dzikim”. Wnioski są słuszne ale dotyczą transkryptów.

Zainteresowana pewnymi metodami chciałam zajrzeć do często cytowanej pozycji literatury Kieser et al.,2000, ale nie znalazłam jej w spisie literatury, natomiast zauważyłam duplikowane te same pozycje literaturowe w wersji a i b. W tym miejscu chciałabym też zwrócić uwagę na inne drobne błędy redakcyjne: na wykresach krzywych wzrostu Rys. 5.2 i 5.28 źle oznaczono oś Y to nie log (OD600) tylko wykres OD600 w czasie przedstawiony w skali półlogarytmicznej, „postanowiono sprawdzić czy białko ParB zaburza organizację DNA podczas tworzenia pierścieni Z” raczej brak białka ParB w mutancie str 161 i wreszcie czysto techniczna uwaga: powinno się unikać dzielenia tabel na dwie strony (jeśli nie wynika to z ich wielkości; str 151/152, 168/169) czy załączania legendy do Rys. na odrębnej stronie.

Wyniki

Imponująca ilość danych doświadczalnych została przedstawiona w sposób logiczny, uporządkowany, udokumentowana świetnej jakości zdjęciami i uzupełniona wynikami analiz ilościowych. Bardzo dobra prezentacja graficzna z legendą do obserwowanych zmian morfologicznych zachodzących w czasie pozwala weryfikować główne wnioski autorki.

Najważniejsze osiągnięcia to:

- wykazano, że wpływ delecji genów *parA* i/lub *parB* w *S. venezuelae* na przebieg sporulacji jest jakościowo podobny: zarodniki pozbawione DNA, nieregularnie rozmieszczone przegrody komórkowe (minikompartmenty i maxikompartmenty) ale znacznie mniejszy niż w *S. coelicolor* (np. zarodniki pozbawione DNA 26% w mutancie *Sc parA* i 17% w *Sc parB* a tylko **10% i 4%** odpowiednio w mutantach *Sv*), wydłużenie strzępek sporulujących w mutantach *parA* obu przedstawicieli, dla *Sv* wykazano też większe tempo wydłużania się strzępek w mutancie *parA* i odwrotny efekt w mutancie *parB* ale za to wydłużenie czasu wzrostu strzępki w *parB*;
- potwierdzono wiązanie się ParB do miejsc *parS* metoda ChIP-seq a także wpływ ParA na interakcje ParB-*parS*;
- wykazano zaburzenia w czasie pojawiania się pierścieni FtsZ(FtsZ-YPet) w mutantach *par*: opóźnienie w mutancie $\Delta parA$ do 15 min po zatrzymaniu się wydłużania strzępki (WT czas 0) a przyspieszenie w mutancie $\Delta parB$ (28 min przed czasem 0 w $\Delta parAB$ nawet 39 min), a w mutancie pozbawionym ParB obserwowano zaburzenia kondensacji DNA;
- wykazano wpływ obniżenia stężenia TopA na wzrost kondensacji DNA chromosomalnego podobnie jak dla *S. coelicolor*.

W strzępkach sporulujących podjęto próbę wizualizacji ParA i ParB w fuzjach z EGFP zastępujących ich natywne odpowiedniki. Według mnie wnioski z tych doświadczeń należy traktować z większą ostrożnością ponieważ szczepy MD004*parA-egfp* i MDO50*parB-egfp* mają fenotyp mutantów z niefunkcjonalnymi lub tylko częściowo funkcjonalnymi ParA i ParB. Szczepy te charakteryzują się one podwyższoną ilością spor bez DNA (odpowiednio **5 i 6%** w porównaniu z **0.4%** w szczepie WT) i zaburzeniami w tworzeniu przegród. Miarą zaburzeń są nie tylko ilości minikompartmentów (mniejszych niż 0.8 μM) ale i nietypowo długie kompartmenty (większe niż 2 μM). które występują odpowiednio w ilościach **2% mini i 16% wydłużonych** w szczepie WT, podczas gdy w *parAegfp* obserwowano co prawda nie zmienioną ilość **minikompartmentów** ale **29,5%** wydłużonych (w porównaniu z **34%** w $\Delta parA$) a w *parBegfp* aż **7% mini i 35%** wydłużonych kompartmentó *versus* **11% i 29%** dla $\Delta parB$.

Zaobserwowano powstawanie dłuższych strzępek i większą szybkość wydłużania się strzępek w *parAegfp* (efekt jak w mutancie delecyjnym), zaobserwowano też inną lokalizację ParA-EGFP niż w *S. coelicolor* (nie w wierzchołku strzępki).

W mutancie *parBegfp* „pomiary wykonano tylko dla 10 strzępek bo obecność fuzyjnego białka ParB-EGFP osłabiła zdolność szczepu MD050 do pełnego różnicowania w warunkach mikroskopowych”, czas różnicowania strzępki był znacznie krótszy w porównaniu ze

szczeniem dzikim, ParB tworzyło nieregularnie rozmieszczone skupiska (a nie jak twierdzi autorka na str 174- regularnie). **Wydaje mi się, że obserwacje zmian można by było łatwiej interpretować używając szczepu z natywnym operonem *parAparB* i z dodatkową kopią *parA-egfp* czy *parB-egfp* w innym miejscu chromosomu o ściśle regulowanej ekspresji.**

W konsekwencji moje zastrzeżenia budzi też użycie mutantów $\Delta topA$ pAV11b *ptcp830-topA* w tle genetycznym *parA-egfp* i *parB-egfp* (szczepy MD401 i MD501) do badania efektu obniżenia stężenia TopA na wzrost strzępek i segregację DNA w czasie sporulacji.

Szczep MD013 z deplecją TopA (delecja *topA* komplementowana przez dodatkową kopię *topA* pod promotorem indukowanym anhydrotetracyklina) rosnąc bez induktora wykazywał 8% ilości TopA, natomiast po indukcji (atet 10 ng/ml) około 12%. Autorka stwierdza, że zarówno bez induktora jaki i z niskim stężeniem induktora szczep ten rósł bardzo powoli na podłożu stałym i „nie był zdolny do tworzenia zarodników” (str 181), prezentowane fotografie wskazują jednak, że 10 ng/ml atet zdecydowanie przyspiesza wzrost i umożliwia sporulację na podłożu stałym i całkowicie odwraca efekt mutacji w czasie wzrostu bakterii w podłożu płynnym (Rys.5.27 i 5.28). Badania mikroskopowe to potwierdziły brak sporulacji i zwiększenie kondensacji DNA bez stosowania induktora i mniejsze ale wyraźne zmiany w kondensacji DNA i zaburzenia tworzenia pierścieni FtsZ w tworzących się strzępkach przy progowym stężeniu induktora.

Proszę o wyjaśnienie dlaczego nie stosowano anhydrotetracykliny do indukcji promotora *pTCP830* w szczepach MD401 i MD501 ($\Delta topA$ pAV11b *ptcp830-topA* w tle genetycznym *parA-egfp* i *parB-egfp* odpowiednio) a więc prowadzono obserwacje typu time-lapse zachowania się ParA i ParB w warunkach braku sporulacji i silnego hamowania wzrostu?

Uzyskano trudne do interpretacji wyniki odwracania efektów deplecji TopA przez fuzje *parA-egfp* (czas wzrostu, długość strzępek) czy przyspieszania lizy strzępek w obecności białek fuzyjnych (silniej *parB-egfp*). **Wydaje mi się, że wpływ deplecji TopA na zaburzenia segregacji chromosomów można by było dopiero ocenić hodując szczep $\Delta topA$ pAV11b *ptcp830-topA* w tle genetycznym z nieuszkodzonym kompletem genów *parAB* i z dodatkową ściśle regulowaną kopią genu *parA-egfp* lub *parB-egfp*, oraz stosując progowe stężenie induktora dla podniesienia stężenia TopA pozwalające na wzrost strzępek i sporulację.**

Dyskusja

Dyskusja jest przeprowadzona logicznie chociaż jak wspomniałam przy omawianiu wyników trudno jest bezkrytycznie przyjmować rezultaty uzyskane w warunkach deplecji TopA i śledzenia częściowo aktywnych białek fluorescencyjnych ParA i ParB w strzępkach *S. venezuelae*. W Dyskusji znalazłam też wiele informacji, które powinny znaleźć się we Wstępie, np. szczegółowe dane dotyczące badań nad *S. coelicolor* czy informacje o udziale białek Par w cytokinezie u *Caulobacter crescentus* a z drugiej strony wiele zbędnych powtórzeń informacji zawartych we Wstępie.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i wartościowe wyniki i otwiera perspektywy dalszych badań. Doceniam ogromny wkład pracy włożony w konstrukcje szczepów, weryfikacje i żmudną analizę uzyskanych zdjęć poklatkowych. Moje krytyczne uwagi poddaję pod rozwagę przy planowaniu dalszych eksperymentów.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Donczew spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Donczew do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

G. Jaguś - Budy