



Prof. dr hab. Anna Skorupska
prof. emerytowany
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Lublin, 19. 04. 2018 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Hołówki

p.t.: „Rola białka HupB w organizacji chromosomu *Mycobacterium smegmatis*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Mikrobiologii Molekularnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Na pracę doktorską składają się dwie współautorskie, oryginalne prace doświadczalne opublikowane w wysoko notowanych czasopismach z bazy JCR: (1) „*HupB: a bacterial nucleoid-associated protein with an indispensable eukaryotic-like tail*”, *mBio* (2017) i (2) „*The origin of chromosomal replication is asymmetrically positioned on the mycobacterial nucleoid and the timing of its firing depends on HupB*”, *Journal of Bacteriology* (2018). Do rozprawy doktorskiej włączono także pracę przeglądową p.t. „*Struktura chromosomu bakteryjnego – metody analizy oddziaływań białko-DNA in vivo*”, opublikowaną w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (2017). W pracach oryginalnych, udział mgr inż. J. Hołówki w wykonaniu badań eksperymentalnych i przygotowaniu pracy do druku jest dominujący i wynosi odpowiednio 60% i 75%. Udział pozostałych autorów afiliowanych w różnych jednostkach został przedstawiony w odrębnych, indywidualnych oświadczeniach podpisanych przez współautorów. W dwuautorskiej pracy przeglądowej udział Doktorantki wynosi 50%. W tych trzech publikacjach składających się na rozprawę doktorską, mgr. J. Hołówka jest pierwszym autorem. Doktorantka jest także współautorem kolejnych dwóch prac eksperymentalnych opublikowanych w *Scientific Reports* (2017) i *mBio* oraz pracy przeglądowej, które nie weszły w skład rozprawy doktorskiej.

Streszczenie, Abstract oraz krótkie Wprowadzenie poprzedzają zasadniczą zawartość pracy doktorskiej.

Modelem badawczym w przedstawionych pracach jest prątek *Mycobacterium smegmatis*, który należy do rodzaju *Mycobacterium*, rząd Actinomycetales (Promieniowce). Jest to model

bardzo użyteczny w badaniach naukowych nad biologią prątków ze względu na niechorobotwórczość i szybki wzrost w porównaniu do innych gatunków *Mycobacterium*. W ostatnich latach w badaniach prowadzonych również w zespole prof. Zakrzewskiej-Czerwińskiej, ustalono, że prątki wydłużają się asymetrycznie na biegunach komórki, co powoduje powstawanie komórek potomnych o różnej długości i różnym tempie wzrostu. Natomiast niewiele badań dotychczas opublikowanych, dotyczyło organizacji chromosomu i udziału w tym procesie białek NAF^r (*nucleoid associated proteins*) licznie występujących w komórce. Jednym z takich białek jest białko HupB, homolog białka HU (*heat unstable*) *E. coli* uczestniczącego w replikacji i organizacji chromosomu. Niewielkie białko HupB (22 kDa) wyróżnia się od innych białek NAP swoją strukturą, mianowicie zawiera dwie domeny, z których domena N-terminalna jest w 40% identyczna z HU *E. coli*, natomiast długa C-końcowa domena (CTD), występująca wyłącznie w promieniowcach, zawiera powtarzające się motywy zasadowych aminokwasów charakterystyczne dla rodziny eukariotycznych histonów H1/H5. Ta domena wiąże nieswoiście DNA, z tendencją do wiązania struktur bogatych w AT. Delecja genu *hupB* nie jest letalna dla mykobakterii, ale w *M. smegmatis* powoduje zwiększoną wrażliwość na czynniki stresowe.

Celem badań ocenianej rozprawy doktorskiej było ustalenie roli białka HupB i jego C-końcowej domeny w organizacji chromosomu *M. smegmatis*, jego dynamiki w ciągu całego cyklu komórkowego oraz określenie wpływu tego białka na inne procesy komórkowe, takie jak replikacja, czy segregacja nowo zreplikowanych regionów chromosomu. Praktyczne znaczenie tych badań wynika z prób znalezienia nowych celów molekularnych do walki z patogenicznymi wielolekoopornymi *M. tuberculosis* powodujących gruźlicę aktualnie szerzącą się na całym świecie.

Dla zbadania lokalizacji HupB w komórkach *M. smegmatis* skonstruowano szczepy zawierające fuzje tego białka z białkiem fluorescencyjnym (FP) zielonej (EGFP) lub czerwonej fluorescencji (mCherry) i obserwowano z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej. Białko HupB-FP wiązało się z DNA tworząc jasne skupiska fluorescencji wzdłuż całego chromosomu, zarówno w fazie logarytmicznej jak i stacjonarnej. Ilość cząsteczek HupB-EGFP w pojedynczych komórkach była szczególnie liczna w fazie logarytmicznej. Dla zbadania roli białka HupB w upakowaniu chromosomu *M. smegmatis* usunięto gen *hupB*, jednak nie stwierdzono istotnej różnicy poziomu upakowania nukleoidu w porównaniu do szczepu dzikiego. Obserwacja lokalizacji makrocząsteczek HupB-EGFP-DNA podczas cyklu komórkowego z użyciem poklatkowej mikroskopii fluorescencyjnej wykazała znaczną dynamikę lokalizacji białka HupB. Zmiany lokalizacji białka były odzwierciedleniem zmian organizacji chromosomu w poszczególnych etapach cyklu komórkowego t.j., replikacji, segregacji czy transkrypcji.

W badaniach nad biologiczną rolą C-terminalnej domeny HupB w organizacji i dynamice chromosomu, skonstruowano delecyjną formę HupB_{ΔCTD} pozbawioną terminalnej domeny CTD. Brak tej domeny w HupB nie wpływał znacząco na wzrost komórek, ale zwiększał ich wrażliwość na izoniazyd. Co więcej, takie białko lokalizowało się głównie w cytoplazmie i nie wiązało się stabilnie do chromosomu *in vivo*, co wykazano posługując się wysoko rozdzielczą mikroskopią PALM i co potwierdziło niezbędną rolę C-końcowej domeny HupB w wiązaniu DNA.

Zastosowanie metody ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation sequencing*) pozwoliło na przedstawienie mapy wiązania HupB z DNA chromosomalnym i wykazanie, że białko to wiąże się nierównomiernie, asymetrycznie wzdłuż całego chromosomu *M. smegmatis*, tworząc największe skupienia w regionie *ori*, co równocześnie wskazało na rolę HupB w organizacji *origin* replikacji w cyklu komórkowym. Skupiska HupB były w większości lokalizowane w obrębie genów (ORF), co również mogło wskazywać na udział tego białka w regulacji ekspresji genów. Liczba związanych cząstek białka stopniowo zmniejszała się w kierunku terminalnych części nukleoidu. Białko z delecją C-terminalnej HupB_{ΔCTD} nie było wykrywane w metodzie ChipP-Seq, co potwierdzało rolę tej domeny w wiązaniu DNA.

Przedstawiona praca wyczerpująco, z zastosowaniem licznych technik molekularnych i mikroskopowych, przedstawia kolejne etapy badań nad znaczeniem białka HupB w organizacji chromosomu i przebiegiem cyklu komórkowego *M. smegmatis*. Na każde z postawionych problemów badawczych Doktorantka konsekwentnie odpowiadała, a uzyskane wyniki podsumowała w Dyskusji na tle światowej literatury.

Ze strony recenzentki chciałbym zapytać, jak, dostępnymi technikami można badać rolę HupB w ekspresji genów tworzących operony lub regulony? Czy planowane są badania nad funkcją innych białek NAPs w cyklu komórkowym?

Podsumowując moją bardzo pozytywną ocenę zawartości merytorycznej tej publikacji, chciałbym szczególnie podkreślić „urodę” opracowania graficznego pracy, na co składają się obrazy uzyskane z różnego typu mikroskopii fluorescencyjnej, filmów ilustrujących dynamikę organizacji chromosomu oraz analizy sekwencyjnej nukleoidu.

Kolejna praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej jest kontynuacją badań nad rolą HupB w replikacji i segregacji chromosomu *M. smegmatis*. Wykorzystując wiedzę, że HupB lokalizuje się wzdłuż chromosomu w czasie całego cyklu komórkowego, zbadano w czasie rzeczywistym dynamikę chromosomu (replisomu) w kolejnych etapach, czyli w czasie inicjacji, replikacji i segregacji nukleoidu. W badaniach wykorzystano fluorescencyjne białko HupB znakujące cały chromosom, białko ParB wiążące się z miejscem inicjacji replikacji *oriC* (badanie segrosomu) oraz białko DnaN, które jest podjednostką polimerazy DNA i pozwala na śledzenie przebiegu replikacji (replisom) wzdłuż całego chromosomu. Najważniejsze wyniki uzyskane w tych badaniach można streścić następująco:

- i) Chromosom *M. smegmatis* jest asymetrycznie zlokalizowany w ciągu niemal całego cyklu komórkowego. Zarówno *oriC* (segrosomy) jak i replisomy lokalizują się w pobliżu starego bieguna komórki w czasie inicjacji replikacji.
- ii) Oznaczono czas przebiegu replikacji całego nukleoidu i stwierdzono, że inicjacja nowej rundy replikacji chromosomu oraz segregacja nowo zreplikowanych regionów chromosomu poprzedza cytokinezę, czyli fizyczne oddzielenie siostrzanych chromosomów. Z tego wynika, że potomne komórki dziedziczą częściowo powielone chromosomy.
- iii) HupB odgrywa znaczną rolę w regulacji inicjacji replikacji, a mutanty delecyjne w tym genie wykazywały niższą częstość reinicjacji replikacji chromosomu w porównaniu do szczepu dzikiego. Nie stwierdzono wpływu HupB na segregację i lokalizację komórkową nowo-zreplikowanych regionów *oriC*.
- iv) Brak białka HupB powodował wydłużenie czasu generacji *M. smegmatis*, co może być konsekwencją opóźnionej inicjacji replikacji kolejnej rundy replikacji i zaburzonej segregacji nowych *oriC*.

Wyniki przedstawione w tej pracy są nowatorskie, wyjaśniają wiele nieopisanych do tej pory elementów replikacji nukleoidu w komórkach prątków, a publikacja jest edycyjnie bardzo dobrze opracowana i uzupełniona filmami obrazującymi etapy replikacji.

Ze strony recenzentki chciałabym przedstawić nieliczne uwagi.

Z przedstawionych w obydwu pracach badaniach wynika, że HupB spełnia ważne funkcje głównie w inicjacji replikacji i przebiegu replikacji cyklu komórkowego. Jednakże brak tego białka, czy brak domeny CTD wiążącej DNA nie powoduje zahamowania replikacji, czy segregacji, a tylko zauważalne zmiany w cyklu komórkowym. Oznacza to, że HupB nie jest istotnym (niezbędnym) białkiem dla przeżywania komórek *M. smegmatis*. Czy delecja HupB, poza wydłużonym czasem generacji powoduje słabsze przeżywanie tych bakterii w optymalnych warunkach? Czy był badany wpływ innych czynników stresowych (poza izoniazidem) na przeżywalność komórek?

Na rozprawę doktorską składa się także praca przeglądowa opisująca metody analizy oddziaływań białko-DNA *in vivo* w badaniu struktury i organizacji chromosomu. W pracy w bardzo dostępny sposób omówiono metody pozwalające na identyfikację miejsc wiązania DNA (footprinting *in vivo*, CHIP-seq - immunoprecypitacja chromatny połączona z głębokim sekwencjonowaniem), metody badania oddziaływań przestrzennych w chromosomie, czy badanie organizacji chromosomu bakteryjnego w wysokorozdzielczej mikroskopii epifluorescencyjnej. Przedstawiona praca wyjaśnia cele i zasady poszczególnych metod i z pewnością będzie użyteczna dla studentów i doktorantów. Chciałabym podkreślić, że ten

przeгляд metod analizy chromosomu został opracowany przez Doktorantki wykorzystujące praktycznie opisane techniki.

W podsumowaniu, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **Pani mgr inż. Joanny Hołówki** prezentuje wysoki poziom naukowy. Przedstawione wyniki badań są oryginalnym rozwiązaniem postawionych problemów naukowych wykonanych z zastosowaniem najnowszych technik molekularnych. W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach i tytule naukowym z dnia 14. marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Dotychczasowy, opublikowany dorobek naukowy przedstawiony w rozprawie doktorskiej w pełni uzasadnia wniosek o nadanie **mgr inż. Joannie Hołowce** stopnia naukowego **doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność biologia molekularna**. Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Hołówki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przyjęcie rozprawy doktorskiej. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową, oryginalność i znaczenie poznawcze pracy, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska