



**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, 15. 11. 2018 r.

### **Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Pióro**

**p.t. Analiza gatunkowo swoistych oddziaływań białek zaangażowanych w segregację chromosomu *Mycobacterium***

**Analysis of species – specific interactions of mycobacterial chromosome segregation proteins**

Poznanie podstaw genetycznych i molekularnych procesów zachodzących w cyklu komórkowym bakterii jest niezwykle ważnym aspektem badawczym. Mechanizmy replikacji, segregacji i podziału komórek należą do tych najważniejszych procesów, których prawidłowy przebieg decyduje o przeżywalności mikroorganizmów w określonych środowiskach. W Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu od wielu lat, z dużym sukcesem prowadzone są badania dotyczące replikacji i segregacji nukleoidu w bakteriach i promieniowcach. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Moniki Pióro została wykonana w tym Zakładzie pod kierunkiem prof. dr hab. Dagmary Jakimowicz. Wyniki badań zostały częściowo opublikowane w wysoko notowanym czasopiśmie *Molecular Microbiology* (2018) w pracy p.t. “*Competition between DivIVA and the nucleoid for ParA binding promotes segrosome separation and modulates mycobacterial cell elongation*” (doi: 10.1111/mmi.14149). W tej współautorskiej pracy, mgr Monika Pióro jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej dominującą rolę w wykonaniu eksperymentów i ich opracowaniu. Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były finansowane z grantu **Harmonia** (2014/14/M/NZ1/00076), Narodowego Centrum Nauki. Bardzo obszerna (126 str.) i

starannie opracowana pod względem redakcyjnym rozprawa doktorska składa się z części wymaganych w pracy doktorskiej takich jak, Streszczenie, (Abstract), Wstęp, Wyniki, Dyskusja i Bibliografia. Jest również Suplement uzupełniający opis kilku eksperymentów nieumieszczonych w Materiałach i Metodach.

**Wstęp** jest dobrze opracowanym, aktualnym przeglądem wiedzy dotyczącej kolejnych etapów cyklu komórkowego bakterii, ze zwróceniem szczególnej uwagi na odmienności tego cyklu w różnych rodzajach bakterii, a szczególnie w *Mycobacterium* spp. Modelowym gatunkiem rodzaju *Mycobacterium* jest *M. smegmatis* ze względu na niepatogenność i szybki wzrost w porównaniu do patogennych, wolno rosnących szczepów *M. tuberculosis*, czy *M. leprae*. Dodatkowo, w *M. smegmatis* możliwe jest zastosowanie wielu technik molekularnych umożliwiających złożone manipulacje genetyczne, które skutecznie zastosowano w tej pracy doktorskiej. Mechanizm replikacji chromosomu, segregacja potomnych replikonów oraz podział komórki jest wspólny dla wszystkich bakterii. Jednak cykl komórkowy promieniowców, w tym *Mycobacterium* sp. jest odmienny od innych bakterii i np. za kontrolę miejsca syntezy peptydoglikanu, jednego ze składników ściany komórkowej u promieniowców, odpowiada białko DivIVA, które jest zlokalizowane wierzchołkowo, co powoduje biegunowe wydłużanie komórek, w odróżnieniu od podłużnego wzrostu u innych bakterii. Białko to jest niezbędne dla *M. smegmatis*, czym różni się od analogicznego białka w *M. tuberculosis*. W cyklu komórkowym *M. smegmatis* obserwuje się asymetrię w wydłużaniu i podziałach komórek, co powoduje powstawanie subpopulacji komórek o różnej długości, różniących się także wrażliwością na antybiotyki. Asymetryczne jest także położenie początku replikacji *oriC*, z czego wynika asymetryczna segregacja chromosomów i ich lokalizacja w całym cyklu komórkowym. Wiązanie białka partycyjnego ParB do sekwencji *oriC* i wiązanie ParA o aktywności ATPazy inicjuje replikację i równoczesną segregację chromosomów. Białka partycyjne w *M. smegmatis* w odróżnieniu do *M. tuberculosis*, nie są niezbędne dla replikacji, ale ich brak lub mutacje wpływają znacząco na proces segregacji. Białko ParA interaguje nie tylko z ParB, ale także z białkiem wierzchołkowym DivIVA, co jest kluczowe dla koordynacji segregacji chromosomów z wydłużaniem komórek u *Mycobacterium* sp. Aktywność DivIVA jest również regulowana przez inne białka komórkowe oraz przez fosforylację i poziom białka DivIVA.

Wstęp jest bardzo ciekawym, przeglądem literatury wprowadzającym czytelnika do złożonych mechanizmów molekularnych funkcjonujących w różnych etapach cyklu komórkowego u różnych bakterii, w tym u *Mycobacterium* sp.

**Pytania dyskusyjne** dotyczące Wstępu:

1. Jak można tłumaczyć fakt, że delecja genów *parAB* *M. smegmatis* ma słabsze oddziaływanie na komórki niż delecja pojedynczych genów *parAB*?
2. Czy może istnieć jakiś inny system, który współdziała z systemem ParAB?
3. Czy geny *parAB* *M. tuberculosis* mogą zastąpić funkcję swoistych genów *M. smegmatis* i odwrotnie?
4. W tytule rozprawy nie ma nazwy *M. smegmatis*, mimo, że niemal cała praca dotyczy tylko tego gatunku.

**Głównym celem** badań przedstawionych w pracy doktorskiej Pani mgr M. Pióro było zbadanie oddziaływań białek ParA z DivIVA poprzez wprowadzenie w białku partycyjnym ParA mutacji punktowych i delekcji. Kolejne cele to zbadanie wpływu zahamowania oddziaływania ParA – DivIVA na segregację i inne procesy cyklu komórkowego oraz zbadanie znaczenia tej interakcji dla przeżywania bakterii w warunkach stresowych.

**Materiały i Metody** to obszerny rozdział tej pracy doktorskiej, co jest całkowicie uzasadnione ogromem materiałów i podłoży użytych w badaniach, opisanie kilkudziesięciu konstruktów, szczepów wyjściowych i modyfikowanych. Liczne często innowacyjne techniki molekularne i mikroskopowe stosowane do badania DNA i białek w *E. coli* i odrębnie w *Mycobacterium* sp. zostały bardzo dokładnie opisane i zilustrowane schematami. Oczywiście, część tych opracowań i konstruktów została wykonana przez innych doktorantów czy magistrantów, ale ich autorstwo było zawsze dokładnie opisane i cytowane w pracy. Większość technik molekularnych i mikroskopowych użytych w pracy jest trudna w wykonaniu i pracochłonna, np. *Konstrukcja oraz przeszukiwanie biblioteki mutantów parA w bakteryjnym systemie dwuhybrydowym (BTH)*, czy konstrukcja wektorów i mutantów ParA stosowanych w różnych analizach mikroskopowych. Precyzja tych badań i ich innowacyjność niewątpliwie przyczyniła się do uzyskania bardzo dobrych efektów i publikacji w wysoko notowanym czasopiśmie.

W każdym laboratorium można spotkać różne „modyfikacje” nazw i określeń w opisie metod. Kilka takich raczej nieprawidłowych wyrażen chciałabym przytoczyć:

str. 39 - trawienie restrykcyjne enzymem restrykcyjnym.. str.40 wytopianie lepkich końców..., str. 41 ..fluorescencję sczytywano.., stężenie białek mierzono na lizatach, str.43 – test galaktozydazowy, str. 46, 61 – wektor potrawiano enzymem. Oczywiście te wyrażenia są zrozumiałe, ale może zbyt „innovacyjne”.

## **Wyniki**

Oddziaływanie białka ParA z DNA jest istotną interakcją, od której zależy rozpoczęcie i przebieg cyklu komórkowego. Wprowadzono trzy różne mutacje punktowe w ParA, a konstrukty fuzyjne z białkiem fluorescencyjnym wprowadzono do *E. coli*. Z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej stwierdzono, że dzika wersja ParA<sub>WT</sub> oraz jeden z mutantów ParAD68A wiąże DNA nukleoidu. Dwa inne mutanty nie wykazywały wiązania DNA i były widoczne w całej komórce. Potwierdzenie oddziaływania ParA<sub>WT</sub> i ParAD68A z DNA i z ParB uzyskano w heterologicznym systemie dwuhybrydowym w *E. coli*. W innych mutantach nie stwierdzono takiego oddziaływania. Również w mikroskopii fluorescencyjnej w *E. coli* stwierdzono kolokalizację białka wierzchołkowego DivIVA z ParA<sub>WT</sub> i ParAD68A. Co ciekawe mutanty nie wiążące DNA i ParB wykazywały silniejsze wiązanie z białkiem wierzchołkowym DivIVA. W kolejnym etapie badań, ze skonstruowanej biblioteki mutantów ParA wyselekcjonowano mutantą, w którym treonina w trzecim kodonie ParA była zastąpiona alaniną (ParAT3A) oraz mutantą z delecją 10 aa w N-końcu białka ParA. W systemie dwuhybrydowym oraz w mikroskopii fluorescencyjnej udowodniono, że zarówno ta mutacja punktowa jak i delecja w N-końcu ParA jest odpowiedzialna za brak wiązania z białkiem wierzchołkowym, lecz nie zaburza oddziaływania ParA z nukleoidem. Co więcej, w teście dwuhybrydowym stwierdzono również brak kolokalizacji zmutowanego białka ParAT3A z białkiem wierzchołkowym DivIVA pochodzących z patogennego *M. tuberculosis*. Brak kolokalizacji zmutowanego białka ParA z białkiem DivIVA potwierdzono w *M. smegmatis* z użyciem poklatkowej mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem kilku konstruktów.

Kolejny etap badań Doktorantki to analiza wpływu mutacji w ParA na zaburzenia wiązania i hydrolizy ATP w procesach wiązania ParA z DNA oraz tworzenia

kompleksu wierzchołkowego w *M. smegmatis*. Analizy prowadzono w preparatach suszonych i przyżyciowych w mikroskopii fluorescencyjnej oraz w mikroskopii wysokorozdzielczej SIM (preparaty przyżyciowe). Stwierdzono, że tylko dzikie białko ParA i mutant ParAR219E niewiążący się z DNA lokalizowały się przejściowo na biegunach i kolokalizowały się z białkiem wierzchołkowym. Pozostałe mutanty ParA nie oddziaływały z DivIVA.

Do badania ruchliwości pojedynczych cząstek ParA i mutantów ParA zastosowano technikę mikroskopową PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*) z użyciem fotoaktywowalnego fluoroforu dołączonego do badanego białka. Stwierdzono, że białko ParA i mutant T3A dyfundują w komórce z podobną średnią szybkością, a liczba nieruchliwych cząstek wynosi w obu przypadkach ok. 50%. Pozostałe mutanty znacznie różniły się ruchliwością od białka typu dzikiego, więcej też było cząstek nieruchliwych w tych szczepach.

Następny etap to badanie wpływu mutacji w genie *parA* na tempo wzrostu i wydłużanie komórek. Stwierdzono, że mutacje w *parA* powodujące brak wiązania z DNA i defekt w wiązaniu i hydrolizie ATP, wpływały na obniżenie tempa wzrostu i zwiększenie długości komórek. Mutant ParAT3A niewiążący się z białkiem DivIVA nie różnił się tempem wzrostu i długością komórek od kontroli.

Mutanty ParA, z wyjątkiem ParAT3A, wykazywały znaczne defekty w segregacji chromosomów, co wynikało ze zmienionej liczby tworzonych segrosomów. Mimo braku w mutancie ParAT3A wyraźnych zmian w segregacji chromosomów badano znaczenie braku oddziaływania ParA-DivIVA na lokalizację i przemieszczanie kompleksów ParB (segrosomów) w korelacji z inicjacją replikacji. W analizie z użyciem poklatkowej mikroskopii fluorescencyjnej ustalono, że ta mutacja w białku ParA powoduje zmniejszenie szybkości przemieszczania segrosomów, ale nie wpływa na asymetrię ich rozdziału do biegunów komórki. Stwierdzono natomiast, że to zmniejszenie szybkości przemieszczania segrosomów w mutancie ParAT3A zmienia w istotny sposób położenie nukleoidu w komórce.

W badaniu wpływu mutacji w ParA na cykl komórkowy *M. smegmatis* użyto mutantu ParAT3A z zahamowanym oddziaływaniem z białkiem wierzchołkowym i mutantu ParAR219E ze zwiększonym oddziaływaniem z DivIVA. Stwierdzono, że obydwie mutacje wpływały na cykl komórkowy, powodowały skrócenie czasu między podziałami oraz zwiększały szybkość wydłużania komórek. Zahamowanie lub

zwiększenie oddziaływań między ParA a DivIVA nie wpływało istotnie na powstawanie przegrody podziałowej oraz na asymetrię wydłużania komórek.

Ostatni etap badań przedstawionych w tej rozprawie, to określenie wpływu warunków stresowych na oddziaływanie ParA i ParAT3 z DivIVA. W analizie wpływu wysuszenia komórek na wzajemne oddziaływanie tych białek w mikroskopii PALM stwierdzono istotną różnicę w mobilności białek, co powodowało różnice w ich lokalizacji w komórce. Wysuszenie wpływało także na wzrost tych bakterii, przy czym liczba tworzonych kolonii przez szczep mutantu ParAT3A była znacznie niższa niż szczepu dzikiego. Brak oddziaływania ParA – DivIVA wpływało negatywnie na przeżywalność bakterii (CFU) i tempo ich wzrostu w warunkach głodzenia. Brak oddziaływania ParA-DivIVA wpływał także na przeżywalność bakterii w obecności antybiotyku (kwasu nalidyksowego) oraz opóźniał wznowienie nowego cyklu komórkowego po usunięciu antybiotyku.

#### **Pytania:**

1. Czy znaczna (50-60%) liczba nieruchliwych cząsteczek ParA w komórkach oznacza, że są to komórki nie dzielące się?
2. Czy w komórce tylko część cząsteczek ParA jest biologicznie aktywna, co by oznaczało nadprodukcję białka ParA?
3. Czy był badany wpływ mutacji punktowych w genie DivIVA na przebieg segregacji?

**W Dyskusji**, napisanej w jasny, możliwie skrócony sposób, Doktorantka podsumowała swoje wyniki badań oraz wnioski wynikające z poszczególnych badań dotyczących białka ParA i mutantów ParA o różnych aktywnościach oraz oddziaływania tych białek z białkiem wierzchołkowym DivIVA. Analizowała również wpływ stresu na aktywność samych białek ParA i mutantów ParA oraz na ich wiązanie z DivIVA. Doktorantka podkreśliła także nowe osiągnięcia, które przyczyniają się do znacznego poszerzenia wiedzy o przebiegu całego cyklu komórkowego *M. smegmatis*. Przedstawiła również schematyczny model złożonych oddziaływań między białkami ParA i DivIVA w cyklu komórkowym.

**W podsumowaniu**, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr. Moniki Pióro prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, wykazuje szeroką wiedzę Doktorantki oraz umiejętność przeprowadzania

zaawansowanych badań eksperymentalnych. Oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym a dotychczasowe osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej uzasadniają nadanie Jej stopnia naukowego **doktora nauk biologicznych**. W związku z tym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr. Moniki Pióro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową i znaczenie poznawcze pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska