

prof. dr hab. Dariusz Bartosik  
Zakład Genetyki Bakterii  
Instytut Mikrobiologii  
Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1  
02-096 Warszawa

Warszawa, 27.11.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Kopera pt.

**„Charakterystyka białek RepB i ich udział w aktywnej segregacji plazmidów *Rhizobium leguminosarum* ”**

wykonanej w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,  
pod kierunkiem dr. hab. Andrzeja Mazura

Naturalne plazmidy bakteryjne są bardzo stabilnie utrzymywane w komórkach swoich gospodarzy. Jest to wynikiem zarówno precyzyjnej regulacji procesu inicjacji replikacji, która determinuje właściwą dla danego replikonu liczbę kopii, jak i aktywności różnego typu systemów, zapobiegających utracie plazmidu bądź eliminujących z populacji bakterii komórki, które go utraciły. Spośród scharakteryzowanych dotąd systemów stabilizujących, szczególną rolę odgrywają systemy partycyjne (ang. *partitioning systems*), zapewniające wielu plazmidom stabilne dziedziczenie na etapie podziału komórki bakteryjnej.

Systemy replikacyjne (REP) i partycyjne (PAR), chociaż są zwykle usytuowane w bliskim sąsiedztwie w genomach plazmidowych, stanowią odrębne moduły genetyczne, których funkcje są kontrolowane przez swoiste elementy regulatorowe. Wyjątek stanowią tzw. moduły *repABC*, charakterystyczne dla plazmidów bakterii z klasy *Alphaproteobacteria*, w których elementy systemu partycyjnego (geny *repA* i *repB*) tworzą wspólny operon z genem *repC*, kodującym białko inicjujące replikację. Obserwujemy więc, w tym przypadku, unikalne sprzężenie, strukturalne i regulacyjne, dwóch, kluczowych dla funkcjonowania plazmidu funkcji, odpowiedzialnych za replikację i segregację materiału genetycznego. Sprzężenie takie jest niewątpliwie korzystne z ewolucyjnego punktu widzenia, o czym świadczy szerokie rozpowszechnienie modułów *repABC* w genomach *Alphaproteobacteria*, gdzie zapewniają one efektywną replikację i stabilne utrzymanie nawet olbrzymich replikonów (megaplazmidów i chromidów), których wielkość może przekraczać rozmiary chromosomów niektórych bakterii.

Poszczególne moduły *repABC*, chociaż mają konserwowaną ogólną strukturę genetyczną, mogą różnić się między sobą, np. (i) liczbą i usytuowaniem sekwencji cetromeropodobnych, stanowiących ważny komponent systemów partycyjnych, czy też (ii) kodowaniem dodatkowych, niewielkich białek, bądź (iii) obecnością elementów wpływających na regulację ekspresji genów operonu. Szczegółowe analizy genetyczne kolejnych identyfikowanych modułów *repABC* są

zatem w pełni zasadne, mogą one bowiem dostarczyć nowych, ważnych informacji na temat zmienności oraz molekularnych podstaw funkcjonowania tych operonów.

Należy zaznaczyć, że genomy większości *Alphaproteobacteria* mają strukturę wieloreplikonową, często zatem w jednej komórce bakteryjnej może współwystępować kilka plazmidów niosących różne moduły *repABC*. Szczepy takie stanowią szczególnie ciekawy model badawczy, dogodny do analiz podstaw niezgodności plazmidów (ang. *incompatibility*), a także potencjalnych wzajemnych interakcji między komponentami pokrewnych systemów replikacyjnych bądź partycyjnych.

Obiektem badań w przedstawionej rozprawie były systemy partycyjne czterech modułów *repABC* obecnych w naturalnych plazmidach szczepu TA1 bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. Należy podkreślić, że moduły te były już charakteryzowane w grupie badawczej kierowanej przez dr. hab. Andrzeja Mazura, a wcześniej przez prof. dr hab. Annę Skorupską. W opublikowanych pracach m.in. scharakteryzowano ich determinanty niezgodności oraz opisano zagadnienia związane z regulacją transkrypcji poszczególnych operonów. Niniejsza rozprawa stanowi zatem wartościowe dopełnienie i rozwinięcie tych badań, dzięki którym otrzymujemy coraz pełniejszy obraz molekularnych podstaw mechanizmów stabilnego współwystępowania modułów *repABC* w wieloreplikonowym genomie bakteryjnym.

Przedstawiona do oceny rozprawa została napisana w języku polskim i ma układ typowy dla większości prac eksperymentalnych, liczy łącznie 130 stron i zawiera 25 ilustracji oraz 2 tabele. Tytuł pracy (*Charakterystyka białek RepB i ich udział w aktywnej segregacji plazmidów Rhizobium leguminosarum*) brzmi jednoznacznie dla czytelnika obeznanego z zagadnieniami mobilomu *Alphaproteobacteria*. Zwracam jednak uwagę, że istnieje również grupa białek RepB, która jest niespokrewniona filogenetycznie z RepB modułów *repABC* (są to białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji plazmidów, powszechne również w *Alphaproteobacteria*). Uważam więc, że w tytule należało jednoznacznie wskazać źródło tych białek, formułując go np. *Charakterystyka białek RepB modułów repABC i ich udział w aktywnej segregacji plazmidów Rhizobium leguminosarum*.

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i językowym. Z obowiązku recenzenta wspomnę jedynie, że zamiast o "zakresie gospodarza plazmidu", powinniśmy mówić o zakresie gospodarzy (np. str. 83), niewłaściwe wydaje mi się również stwierdzenie, że białka kodowane są "na plazmidzie" bądź "na chromosomie" (np. str. 88). Należy również pamiętać, że biowar nie stanowi jednostki taksonomicznej bakterii, dlatego też jego nazwa (np. bv. trifolii) nie powinna być pisana kursywą, jak ma to miejsce w ocenianej pracy.

Rozprawę rozpoczyna 32 stronicowy Wstęp, składający się z czterech rozdziałów. W pierwszym z nich Doktorant przedstawił pokrótce ogólną charakterystykę plazmidów oraz genomów złożonych, których istotnym komponentem są niezbędne komórkom replikony pozachromosomowe, czyli chromidy. Drugi, bardziej obszerny rozdział, opisuje mechanizmy warunkujące stabilne utrzymywanie plazmidów w komórkach bakterii. Ze zrozumiałych względów, szczególny nacisk położono w nim na opis partycyjnych systemów stabilizujących, przedstawiając m.in. strukturę modelowych *loci* i ich klasyfikację oraz modele segregacji

plazmidowego DNA. Trzeci rozdział opisuje podstawy symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi, a czwarty charakteryzuje szczegółowo plazmidy z rodziny *repABC* oraz przedstawia podstawowe dane na temat plazmidów pRleTA1a-pRleTA1d, których moduły replikacyjno-partycyjne stanowiły obiekt badawczy ocenianej rozprawy.

Myślą przewodnią Wstępu są zatem plazmidy z wyraźnie zaakcentowaną problematyką genomów wieloreplikonowych. Uważam, że zamieszczenie w nim równocennego rozdziału dotyczącego symbiozy ryzobiów, zaburzającego główny wątek tematyczny, nie jest właściwe. Zapewne z korzyścią dla struktury tej części rozprawy byłoby utworzenie podrozdziału w rozdziale 4, w którym informacje na temat symbiozy można byłoby przedstawić, opisując bakteryjnych gospodarzy plazmidów *repABC*.

W kolejnym rozdziale pracy opisano szczegółowo wykorzystane materiały oraz zastosowane metody badawcze. Do badań użyto wyłącznie szczepów bakterii oraz plazmidów zdefiniowanych pod względem genetycznym. Moja drobna uwaga dotyczy opisu fenotypu oporności trzech plazmidów na str. 39. Według powszechnie przyjętych reguł, oporność na antybiotyki determinowana przez geny plazmidowe powinna być oznaczana kodem dwuliterowym, pisanym wielką literą (np. Ap<sup>r</sup> - oporność na ampicylinę), natomiast analogiczny fenotyp uwarunkowany genami chromosomowymi określa się kodem trzyliterowym (np. Amp<sup>r</sup>). Ponadto, wiele danych w tym rozdziale przedstawiono w formie tabelarycznej, nie przypisując tabelom kolejnych numerów.

Cel naukowy, mający przekonać czytelnika rozprawy o zasadności podjęcia opisanych badań, oraz sposoby jego realizacji, zostały sformułowane jednoznacznie. Głównym zamierzeniem Doktoranta było eksperymentalne zdefiniowanie komponentów systemów partycyjnych czterech modułów *repABC* plazmidów szczepu *R. leguminosarum* bv. trifolii TA1. Główny nacisk położono na scharakteryzowanie białek RepB oraz określenie ich roli w segregacji poszczególnych replikonów.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono jednak bardziej podstawową charakterystykę modułów *repABC*, mającą na celu określenie ich minimalnych replikonów oraz uzyskanie w pełni funkcjonalnych kaset partycyjnych. Obydwa zadania zostały w pełni zrealizowane. Wykazano, że systemy REP i PAR stanowią odrębne jednostki funkcjonalne, a dzięki wykorzystaniu precyzyjnie zaprojektowanych konstruktów genetycznych, w układach badawczych *in vivo* (*in cis* oraz *in trans*), zgromadzono dane pomocne w zdefiniowaniu elementów składowych analizowanych systemów.

Za najważniejsze obserwacje poczynione w tej części pracy należy uznać: (i) identyfikację potencjalnych sekwencji centromeropodobnych *parS* i wykazanie ich roli w stabilizacji poszczególnych replikonów, co było szczególnie istotne w przypadku plazmidów pRleTA1a i pRleTA1d, których *parS* nie wykazywały podobieństwa do ustalonych wcześniej sekwencji konsensusowych, oraz (ii) wykazanie, że białka RepB poszczególnych modułów *repABC* nie wchodzi w interakcje krzyżowe z sekwencjami *parS* innych plazmidów.

We wstępnym etapie drugiej części pracy przeprowadzono szczegółowe analizy porównawcze sekwencji aminokwasowych białek RepB. Przyniosły one sugestie dotyczące

obecności w tych białkach potencjalnego motywu HTH oraz domeny dimeryzacyjnej, których lokalizację zweryfikowano w toku dalszych eksperymentów.

Ważnym zadaniem tej części badań była nadprodukcja czterech białek RepB, w komórkach *Escherichia coli*, oraz uzyskanie ich oczyszczonych form. Nie było to jednak łatwe, wymagało bowiem zoptymalizowania układu ekspresyjnego dla każdego z białek, co wiązało się z ustaleniem parametrów hodowli, indukcji ekspresji genów fuzyjnych oraz niekiedy doboorem alternatywnego systemu ekspresji, a w końcowym etapie wymagało także optymalizacji parametrów procesu chromatografii. Podejście to zakończyło się pełnym powodzeniem, co świadczy o doskonałym przygotowaniu technicznym i dobrze rozwiniętym warsztacie badawczym Doktoranta.

Oczyszczone preparaty białek posłużyły do dalszych analiz, których wyniki dowiodły, że białka RepB (i) wiążą się specyficznie z sekwencjami centromeropodobnymi *parS* macierzystych replikonów, z wyjątkiem RepB plazmidu pRITA1a, (ii) nie wchodzi w interakcje krzyżowe z *parS* innych plazmidów oraz (iii) tworzą dimery i formy wyższego rzędu. Dzięki konstrukcji i analizie licznych wariantów delecyjnych jednego z analizowanych białek RepB, potwierdzono eksperymentalnie obecność i lokalizację motywu HTH oraz domeny dimeryzacyjnej, a także wskazano region tego białka zaangażowany w interakcje z białkiem RepA. Wykazano tym samym modułową strukturę białek partycyjnych RepB i uzyskano dowody wskazujące, że powstanie form dimerycznych/oligomerycznych RepB jest etapem niezbędnym do wiązania tego białka z sekwencjami *parS*.

Uzyskane wyniki podsumowano i omówiono rzeczowo w rozdziale Dyskusja, odnosząc je do dostępnych danych literaturowych (bibliografia rozprawy jest bardzo obszerna i liczy łącznie 172 pozycje). W rozdziale tym przedyskutowano także dwie ciekawe obserwacje, które stanowią odstępstwo od ogólnie przyjętych schematów. Pierwsza z nich dotyczy modułów *repABC* plazmidów pRleTA1b i pRleTA1c, których kasety partycyjne, niosące natywny układ dwóch sekwencji *parS*, warunkowały mniejszą stabilność plazmidu testowego niż kasety z jedną *parS*. Drugi zaskakujący wynik to brak oddziaływań *in vitro* oczyszczonego białka RepB plazmidu pRleTA1a z wytypowaną sekwencją *parS*, mimo iż analizy *in vivo* wskazywały na jej funkcje centromerowe. Doktorant przedstawił prawdopodobne podłoże tych nieoczekiwanych zjawisk, które z pewnością należy w przyszłości eksperymentalnie zweryfikować.

Uzyskane w rozprawie wyniki potwierdzają, że replikony *repABC* mimo konserwowanej struktury stanowią dość zróżnicowaną grupę, biorąc po uwagę molekularne mechanizmy funkcjonowania ich systemów partycyjnych i replikacyjnych. Wskazuje na to także różna stabilność, skonstruowanych w tej pracy, minimalnych replikonów modułów *repABC* (Fig. 19), co nie zostało jednak skomentowane w Dyskusji.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktoranta oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego badań naukowych. Dzięki logicznie zaprojektowanym eksperymentom, odpowiedniemu doborowi i wnikliwej analizie kolejnych mutantów oraz zastosowaniu właściwych kontroli, Doktorant poczynił wiele wartościowych obserwacji, które prowadzą do konkluzji, że wysoce specyficzne oddziaływania pomiędzy białkami RepB a

odpowiadającymi im sekwencjami centromeropodobnymi mogą stanowić kluczowy element zgodnej segregacji grupy pokrewnych replikonów współwystępujących w komórce bakterii. Wyniki te stanowią zatem ważny wkład do ogólnej wiedzy na temat plazmidów *repABC*, które są powszechnym komponentem wieloreplikonowych genomów ryzobiów. W tym miejscu należy zaznaczyć, że wyniki ocenianej rozprawy zostały w bieżącym roku opublikowane w wysoko cenionym przez mikrobiologów czasopiśmie *Molecular Microbiology*. Zyskały one więc już wcześniej pozytywne opinie wymagających specjalistów i edytorów naukowych.

Uważam, że oceniana praca całkowicie spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę więc do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr. Piotra Kopera do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową przeprowadzonych badań oraz ich opublikowanie w uznanym periodyku, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik