

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana mgr. Tomasza Łebkowskiego**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Fosforylacja inicjatorowego białka DnaA u *Streptomyces coelicolor* – molekularny mechanizm i biologiczna funkcja**

Poznanie molekularnych podstaw procesów zachodzących w cyklu komórkowym bakterii jest bardzo ważnym aspektem badawczym. Mechanizmy inicjacji procesu replikacji, segregacji genomów i podziału komórek bakterii należą do kluczowych procesów, a ich prawidłowy przebieg decyduje o przeżywalności mikroorganizmów w określonych środowiskach.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Tomasza Łebkowskiego została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani promotor prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej oraz opieką naukową promotora pomocniczego dr. Marcina Wolańskiego. Przedstawione badania były finansowane z projektów Narodowego Centrum Nauki: Maestro 2 i Preludium 13.

Dorobek naukowy mgr. T. Łebkowskiego to dwie publikacje w wysoko-notowanych czasopismach: *Applied Microbiology and Biotechnology* (2016) "Two transcription factors, CabA and CabR, are independently involved in multilevel regulation of the biosynthetic gene cluster encoding the novel aminocoumarin, cacibiocin" (DOI: 10.1007/s00253-015-7196-7) IF=3.4 oraz w *J. Bacteriology* (2020) "AfsK-mediated site-specific phosphorylation regulates DnaA initiator protein activity in *Streptomyces coelicolor*" (DOI: 10.1128/JB.00597-19) IF 3.67. Są to publikacje współautorskie, a w drugiej pracy Doktorant jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jego dominującą rolę w wykonaniu doświadczeń i opracowaniu publikacji.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr. T. Łebkowskiego jest kontynuacją i rozwinięciem badań nad replikacją genomów bakteryjnych, prowadzonych z dużym sukcesem przez zespół prof. J. Zakrzewskiej-Czerwińskiej. W skład ocenianej rozprawy doktorskiej wchodzi Streszczenie (w jęz. polskim i angielskim), obszerny Wstęp, Metodyka badań, Opis wyników, Dyskusja, Spis literatury i inne załączniki.

Wstęp

Modelem badawczym w przedstawionej rozprawie są gram-dodatnie bakterie należące do typu Actinobacteria (promieniowce) i rodzaju *Streptomyces*. Bakterie te występują głównie w glebie i środowiskach wodnych. Opisano także kilka gatunków patogennych dla roślin i ludzi. Ważną cechą tych bakterii jest produkcja enzymów hydrolitycznych oraz niskocząsteczkowych związków o cennych właściwościach antybiotycznych, przeciwgrzybowych i immunosupresyjnych wykorzystywanych w medycynie. Wybrany do badań saprofityczny gatunek *Streptomyces coelicolor* ma złożony cykl życiowy, który rozpoczyna się od kiełkowania zarodnika, z którego rozwija się grzybnia wegetatywna złożona ze stopniowo wydłużających i rozgałęziających się strzępek. W strzępkach powstają poprzeczne przegrody dzielące komórki na różnej wielkości kompartmenty. Co ciekawe, w kompartmentcie może tworzyć się nawet kilkadziesiąt kopii chromosomalnego DNA. W dalszym procesie, po wyczerpaniu składników odżywczych w podłożu, z grzybni wegetatywnej powstaje grzybnia powietrzna, w której dochodzi do kondensacji i segregacji materiału genetycznego, a proces replikacji DNA kończy się tuż przed tworzeniem zarodników. W dalszych procesach dojrzewania grzybni następuje rozdzielanie łańcuchów spor na pojedyncze spory, a pojedynczy zarodnik zawiera jedną kopię DNA. Złożony mechanizm cyklu życiowego *Streptomyces* jest regulowany przez wiele mechanizmów, a jednym z tych procesów jest fosforylacja określonych białek.

W obszernym i bardzo dobrze opracowanym **Wstępie**, Doktorant opisał główne etapy procesu inicjacji replikacji DNA; przedstawił znaczenie fosforylacji białek (kinaz białkowych) w replikacji DNA, opisał strukturę i funkcję regionu *oriC* replisomów bakterii, enzymy uczestniczące w inicjacji i elongacji DNA oraz procesy regulacyjne działające w inicjacji replikacji w *Streptomyces*.

Głównym celem badań przedstawionych w pracy doktorskiej mgr. T. Łebkowskiego było poznanie biologicznej roli fosforylacji inicjatorowego białka DnaA w modelowej bakterii *Streptomyces coelicolor*. Problem funkcji i znaczenia tej modyfikacji DnaA w procesie inicjacji replikacji nie został do tej pory zbadany. Dodatkowo, podjęto próby wyjaśnienia molekularnego mechanizmu fosforylacji DnaA oraz innych białek uczestniczących w modyfikacji potranslacyjnej inicjatora replikacji w *S. coelicolor*.

Materialy i Metody to również bardzo obszerny (30 str.) rozdział tej pracy doktorskiej, co jest całkowicie uzasadnione ogromem materiałów, podłoży, szczepów, konstruktów, technik użytych w badaniach DNA i białek *Streptomyces*. Dobór zastosowanych technik niewątpliwie przyczynił się do uzyskania bardzo dobrych wyników tej rozprawy i może być będzie pomocny w kształceniu kolejnych doktorantów.

W każdym laboratorium można spotkać różne „modyfikacje” nazw i określić w opisie metod, także w tej rozprawie można takie zauważyć, np.:

Str. 33. I.3. i inne miejsca. „...sporządzenia mediów hodowlanych...” Słowa „medium, media” mają też, jak wiadomo, inne znaczenie, a „media hodowlane” to brzmi dziwnie. Właściwsze słowo to: „podłoże”.

Str. 54. L.15. i in. „...w przypadku grupy odnośnikowej...” Dlaczego nie „grupy kontrolnej”?

Str.55, Tabela 3.10 i in.. „Kompozycja wykorzystanych w pracy żeli...” To jest po prostu „skład” żeli.

Wyniki

Badania rozpoczęto od potwierdzenia fosforylacji białka DnaA w *S. coelicolor*. Wprawdzie wcześniej opublikowano analizę fosfoproteomów tej bakterii, lecz tylko w jednej publikacji zidentyfikowano ufosforylowane białko DnaA. Dla potwierdzenia fosforylacji inicjatorowego białka DnaA Doktorant zastosował początkowo metodę chromatografii cieczowej z wykorzystaniem różnych złożeń, jednakże nie udało się potwierdzić fosforylacji tego białka. Kolejną próbę identyfikacji fosforylacji DnaA Doktorant przeprowadził metodą spektrometrii mas z udziałem pracowników Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie. Również w tym eksperymencie nie uzyskano pozytywnych wyników. Dopiero w kolejnych badaniach, przy zastosowaniu metody immunoprecypitacji białek z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfo-treonina, jednoznacznie potwierdzono fosforylację inicjatorowego białka DnaA.

W dalszym etapie badań oznaczono fazę cyklu rozwojowego *S. coelicolor*, w której zachodzi fosforylacja DnaA. Ufosforylowane białko zidentyfikowano w grzybni wegetatywnej i powietrznej, lecz nie obserwowano tej modyfikacji w zarodnikach. Oznacza to, że DnaA jest fosforylowane tylko w tych fazach wzrostu gdzie zachodzi replikacja chromosomalnego DNA. Kolejnym celem badań była analiza wpływu fosforylacji treoniny 486 na konformację białka DnaA. Modelowanie molekularne *in silico* na bazie krystalicznego białka DnaA *Aquifex aeolicus* zostało wykonane z udziałem pracownika Wydziału Biotechnologii UG i UMG. Modelowanie *in silico* przeprowadzone dla białek DnaA dzikiego typu, pseudo-fosforylowanego mutantu DnaA T486D z substytucją treoniny kwasem asparaginowym i DnaA T486TP z fosforylacją treoniny. Uzyskane modele molekularne DnaA wykazały, że białko to składa się z czterech domen (I, II, III –IV) oraz regionu łącznikowego występującego w C-końcu III domeny. Z tych badań wnioskowano, że fosforylacja białka inicjatorowego DnaA wpływa na jego konformację - zmienia się wzajemne położenie domen III i IV, a region łącznikowy wiążący nukleotyd ulega poszerzeniu.

Badania dichroizmu kołowego przeprowadzono na oczyszczonych białkach DnaA - dzikiego typu i zmodyfikowanymi T486D i T486A (podstawienie treoniny alaniną). Analiza widm tych trzech wersji białka wykazała, że struktura drugorzędowa białka dzikiego typu i białka pseudo-fosforylowanego T486D są podobne, natomiast widmo DnaA T486A znacznie się różniło, co oznaczało negatywny wpływ tego białka na strukturę DnaA. W analizie aktywności ATP-azowej białka DnaA wykazano dwukrotnie większą aktywność dla białka pseudo-fosforylowanego w porównaniu do białka dzikiego typu. Natomiast analiza powinowactwa tych białek do regionu całego *oriC* i jego skróconej wersji, badana metodą opóźnionej migracji w żelu (EMSA) wykazała słabsze wiązanie białka T486D do *oriC* w porównaniu do białka dzikiego.

W kolejnym etapie pracy, Doktorant podjął badania nad enzymami uczestniczącymi w potranslacyjnej modyfikacji białka DnaA. Spośród szeregu mutantów *S. coelicolor* delecyjnych w genach dla kinaz zidentyfikowano gen dla kinazy AfsK, którego delecja prowadziła do braku fosforylacji DnaA, a komplementacja tej mutacji przywracała tę modyfikację. Oczyszczona domena katalityczna (CD) kinazy AfsK w obecności ATP była zdolna do fosforylacji DnaA. Kinaza AfsK lokalizuje się subkomórkowo, głównie w wierzchołkach grzybni. Dla sprawdzenia, czy kinaza AfsK wpływa na proces replikacji *in vivo*, usunięto gen *afsK*, lecz jego delecja nie powodowała istotnej zmiany lokalizacji replisomów. Natomiast nadprodukcja kinazy AfsK w skonstruowanym szczepie *S. coelicolor*, w istotny sposób zmieniała lokalizację replisomów przesuwając je w kierunku wierzchołka grzybni, co przedstawiono w mikroskopii fluorescencyjnej.

Dyskusja

W tej części rozprawy Doktorant podsumowuje, ale też uzupełnia wyniki swoich badań na tle już opisanych w literaturze, zwracając również uwagę na nieopisane mechanizmy regulujące inicjację replikacji chromosomów; np. nie wiadomo jaki jest mechanizm „wybierania” z całej puli chromosomów tych, które są replikowane w obrębie kompartmentu *Streptomyces*. Autor dowodzi, że fosforylacja białka DnaA reguluje inicjację replikacji chromosomalnego DNA w fazach aktywnego wzrostu grzybni. Ważną obserwacją jest też fakt, że aktywność inicjatorowa DnaA ulega zmianie w związku ze zmianą konformacji domen i tym samym ekspozycji kieszeni wiążącej nukleotyd ATP. Reszta treoniny jest fosforylowana potranslacyjnie w III, C-końcowej domenie DnaA. Na regulację częstości inicjacji DNA wpływa także poziom aktywności ATP-azowej białka DnaA, co udowodniono w eksperymentach z mutantami DnaA. Nadmierna aktywność ATP-azowa pod wpływem fosforylacji może powodować gromadzenie się DnaA w kompleksie z ADP, co powoduje zahamowanie inicjacji replikacji. Doktorant przedstawił także wyniki badań nad

kinazą AfsK fosforylującą białko inicjatorowego DnaA. Stwierdzono, że komplementacja delekcji genu *afsK* przywracała fosforylację białka inicjatorowego DnaA. Również oczyszczona domena katalityczna AfsK CD oddziaływała z białkiem DnaA.

Niektóre doświadczenia opisane w Wynikach i uzupełnione w Dyskusji, mimo dużego wkładu pracy, zakończyły się niepowodzeniem. Doktorant szczegółowo wyjaśnia prawdopodobne przyczyny niepowodzeń, co uważam za bardzo pozytywne podejście do własnych badań. Autor również krytycznie odnosi się do niektórych pozytywnych doświadczeń, tłumacząc swoje wątpliwości, co należy uznać za niespotykany element rozpraw doktorskich. Uważam, że dokładnie opisany przebieg wszystkich doświadczeń (udanych i nieudanych) stanowi dużą wartość przedstawionej pracy mgr. Łebkowskiego.

Do głównych osiągnięć Doktoranta można zaliczyć:

1. Potwierdzenie fosforylacji białka inicjatorowego DnaA metodą immunoprecypitacji.
2. Ustalenie, że fosforylacja DnaA zachodzi tylko w tych fazach wzrostu grzybni, gdzie zachodzi replikacja DNA.
3. Ustalenie, że fosforylacja DnaA powoduje zmianę konformacji białka inicjatorowego.
4. Określenie funkcji i lokalizacji komórkowej kinazy AfsK *S. coelicolor*.

Pytania: Czy Doktorant planuje w dalszej swojej pracy naukowej kontynuację badań nad replikacją DNA na modelu *Streptomyces*, czy może na innych bakteriach? Jaka część tych badań sprawiła Panu największy problem?

W podsumowaniu, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr. Tomasza Łebkowskiego** prezentuje wysoki poziom naukowy, szeroką wiedzę Doktoranta, a także interesujące podejście do własnych osiągnięć. Przedstawiono bardzo ciekawe wyniki uzyskane z zastosowaniem wielu metod i technik molekularnych, które pozwoliły na uzyskanie nowych informacji dotyczących mechanizmu inicjacji replikacji DNA *Streptomyces coelicolor*. Część tych badań została opublikowana w czasopiśmie *J. Bacteriol.* 2020.

W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Tomasza Łebkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przyjęcie rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową, oryginalność i znaczenie poznawcze pracy, składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska