

czwartek, 13 kwietnia 2017

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej **mgr Damiana Trojanowskiego** pt. „**Analiza dynamiki replisomów w trakcie cyklu komórkowego *Mycobacterium smegmatis***”.

Promotor ocenianej pracy, Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska i kierowany przez nią zespół Zakładu Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii UW to uznany na świecie autorytet w dziedzinie replikacji materiału genetycznego bakterii. Realizacja pracy doktorskiej w takim zespole stawia przed Doktorantem oczekiwania, rozwiązania istotnych problemów naukowych oraz wniesienia znaczącego wkładu w badane przez niego zagadnienia. Z drugiej strony Doktorant miał do dyspozycji bogaty, wyszukany warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową i co najważniejsze wiedzę i doświadczenie naukowe promotora. Bardzo miło mi, jako recenzentowi, po lekturze pracy doktorskiej stwierdzić, że te wysokie oczekiwania zostały w pełni spełnione.

Pracę doktorską Pana mgr Damiana Trojanowskiego stanowi zbiór bardzo spójnych tematycznie dwóch prac eksperymentalnych opublikowanych w czołowych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku cytowalności $IF > 12$ oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w języku polskim. We wszystkich ww. pracach Doktorant jest pierwszym autorem a dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do jego kluczowej roli w realizacji opisywanych badań.

Przedmiotem zainteresowania Doktoranta jest dynamika procesu replikacji u przedstawiciela szybko rosnących mykobakterii *M. smegmatis*, stanowiącego organizm modelowy dla badań prątków gruźlicy. Biorąc pod uwagę znaczenie kliniczne tej grupy drobnoustrojów oraz bardzo ograniczoną wiedzę o procesach replikacji DNA u tej grupy organizmów oraz specyficzne cechy podziałów komórkowych mykobakterii (wzrost wierzchołkowy, asymetryczna lokalizacja



przegrody podziałowej) wybraną tematykę badań należy uznać jako bardzo aktualną i ciekawą. Badania dynamiki procesu replikacji DNA *M. smegmatis* zostały przeprowadzone w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej oraz rekombinowanych szczepów bakteryjnych poddających ekspresji wybrane białka replisomu w fuzji z białkami fluorescencyjnymi. Załączone publikacje stanowiące podstawę recenzowanej pracy doktorskiej zostały poprzedzone krótkim wprowadzeniem opisującym tło naukowe oraz najważniejsze osiągnięcia prezentowanych prac. Doktorant cytując odpowiednią literaturę stwierdza (str. 9), że asymetryczne komórki potomne prątków mogą różnić się wrażliwością na antybiotyki (cykloserynę, meropenem, ryfampicynę i izoniazyd). **Czy opisane różnice w lekooporności mają charakter fenotypowy czy genetyczny? Jakie mechanizmy molekularne tłumaczą opisane zjawisko ?** Zdanie opisujące stosowanie w terapii gruźlicy leków przeciwprątkowych oraz nabywania przez prątki lekooporności, uważam za zbyt daleko idący skrót myślowy („W terapii chorób wywoływanych przez ...”, str 9). **Dla wyjaśnienia tego zagadnienia prosiłbym Doktoranta o syntetyczne porównanie mechanizmów nabywania oporności przez prątki gruźlicy i inne chorobotwórcze bakterie podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.**

Badania opublikowane w *mBio* (Trojanowski i wsp., 2015) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem rekombinowanych szczepów *M. smegmatis* poddających ekspresji białko beta klamry (DnaN), białko wiążące penicylinę (PBP) oraz białko segregacyjne ParB w fuzji z odpowiednimi białkami fluorescencyjnymi. Zastosowanie mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej w czasie rzeczywistym pozwoliło na bezpośrednie śledzenie w pojedynczych komórkach lokalizacji replisomu (DnaN), miejsca inicjacji replikacji (ParB) oraz tworzącej się przegrody komórkowej (PBP). Doskonale zaplanowane eksperymenty, ekspresja białek fuzyjnych z natywnych promotorów oraz loci chromosomalnych, opracowana metoda obrazowania komórek bakteryjnych pozwoliła na poczynienie bardzo ciekawych obserwacji kompleksowo opisujących przebieg procesu replikacji DNA prątków w odniesieniu do podziału komórki. Ogromna wiedza i doświadczenie zespołu w badaniach procesu replikacji pozwoliła na właściwe zinterpretowanie ogromu pozyskanych danych w postaci zdjęć i filmów poklatkowych. Autorzy wykazali, że replisom w komórkach *M. smegmatis* nie jest zlokalizowany centralnie oraz ulega cyrkulacji na 10-20% długości komórki podczas procesu replikacji. Zaobserwowano, że proces replikacji jest inicjowany 15 min. po uformowaniu przegrody komórkowej i trwa do



140 min. Czas od zakończenia replikacji do uformowania przegrody komórkowej określono na 30-40 min. Lokalizacja *oriC* poprzez ParB-mCherry wykazała, że replisom tworzy się w jego sąsiedztwie. Badania szczepów pozbawionych białka ParB lub nadprodukujących to białko wykazały zaburzony dystans pomiędzy replisomami oraz zmiany w liczbie replisomów, wskazując jego rolę w ich lokalizacji i organizacji.

Badania opublikowane w *Scientific Reports* (Trojanowski i wsp., 2017) są kontynuacją i poszerzeniem wcześniej opublikowanych badań Doktoranta. W pracy tej autorzy poddali ekspresji w komórkach prątków dodatkowe białko fuzyjne stanowiące katalityczną podjednostkę polimerazy III z białkiem żółtej fluorescencji. Białko to wraz z wcześniej uzyskanym białkiem DnaN-mCherry lokalizowało do replisomu, lecz pozostawało z nim związane krócej niż beta-klamra. Zastosowanie obu białek fuzyjnych lokalizujących replisom do badań jego dynamiki pozwoliło na identyfikację około 10% frakcji komórek w których proces replikacji jest inicjowany przed zakończeniem poprzedniej rundy co po raz pierwszy zostało opisane dla wolno-rosnących bakterii. Reinicjacja replikacji nie była prostym odzwierciedleniem tempa wzrostu, gdyż zjawisko to wciąż obserwowano w komórkach na podłożu minimalnym a w warunkach obniżonej temperatury częstość tego procesu nawet ulegała zwiększeniu do 25%. Autorzy tłumaczą obserwowane zjawisko prawdopodobnym procesem kompetycji pomiędzy siostrzanymi komórkami w stosunku do czynników limitujących proces inicjacji replikacji.

Praca przeglądowa opublikowana w *Post. Hig. Med. Dośw.* (Trojanowski i wsp., 2014) to ciekawie napisany zbiór metod stosowanych dla poszukiwania nowych inhibitorów dla bakteryjnych białek procesu replikacji. W pracy tej autorzy opisują przebieg bakteryjnej replikacji a następnie skupiają się na wysoko-przepustowych metodach identyfikacji potencjalnych leków przeciwbakteryjnych, których tarczami molekularnymi byłyby białka replisomu. Praca ta została dobrze napisana i z pewnością będzie pomocnym materiałem dla studentów i młodych pracowników naukowych rozpoczynających swoje poszukiwania naukowe w tym kierunku.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że w każdej z opublikowanych prac wchodzących w skład pracy doktorskiej Pana Damiana Trojanowskiego na uwagę zasługuje nie tylko ogrom zgromadzonych wyników, ich profesjonalne omówienie i przedstawienie ale również dyskusja przeprowadzona w sposób bardzo profesjonalny, świadczący o świetnej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań. Na podkreślenie



zasługuje także świetny warsztat badawczy Doktoranta, umiejętność doboru właściwych kontroli eksperymentów oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

Prosiłbym Doktoranta o podzielenie się podczas publicznej obrony swoimi przemyśleniami na poniższe kwestie:

- Czy zdolność do re-inicjacji replikacji u prątków jest procesem „dziedzicznym”, tzw. czy u komórek powstałych z komórek reinicjujących replikację częściej obserwuje się to zjawisko ?
- Jakie czynniki limitujące inicjację procesu replikacji mogą być kluczowe dla obserwowanego zjawiska re-inicjacji ?
- Czy nadprodukcja białka DnaA w obecności ATP, lub jego niedobory zmieniłyby częstość obserwowanego zjawiska re-inicjacji replikacji ?
- Czy tempo syntezy DNA u *M. smegmatis* (400 bp/s), 8-krotnie wyższe niż u prątków gruźlicy (50 bp/s) jest przyczyną czy raczej wynikiem różnic w tempie wzrostu tych bakterii ?
- Czy oprócz różnic dotyczących czasu replikacji DNA i podziałów komórkowych zidentyfikowano znaczące różnice w przebiegu i/lub regulacji tych procesów, lub w homologii zaangażowanych w te procesy białek, u *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* ?

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana Damiana Trojanowskiego uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Damiana Trojanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane niezwykle cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pana Damiana Trojanowskiego przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek