



UNIwersytet Gdański



WYDZIAŁ
BIOLOGII

UNIwersytet Gdański

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 15.04.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Tomasza Łebkowskiego
**„Fosforylacja inicjatorowego białka DnaA u *Streptomyces coelicolor* –
molekularny mechanizm i biologiczna funkcja”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem promotora, Pani prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej, oraz dr Marcina Wolańskiego, jako promotora pomocniczego. Celem rozprawy było określenie roli nietypowego dla bakterii procesu fosforylacji białka DnaA w procesie replikacji DNA u bakterii *Streptomyces coelicolor*. Replikacja materiału genetycznego jako podstawowy proces życiowy we wszystkich organizmach jest obiektem badań biologów molekularnych i biochemików od wielu dziesięcioleci, bakterie zaś stanowiąc dogodny model badawczy, potrafią nadal pokazać nowe możliwości regulacji tego procesu. Organizmy jednokomórkowe przystosowując się do zmian w środowisku, rozwinęły szereg mechanizmów precyzyjnie dopasowujących procesy życiowe tak, by zoptymalizować zużycie energii

metabolicznej. Bakterie o bardziej złożonym niż klasyczna *Escherichia coli* cyklu rozwojowym są szczególnie atrakcyjnym modelem do badań skomplikowanych procesów regulacyjnych zachodzących w różnych fazach wzrostu. Takim organizmem jest *Streptomyces coelicolor*, Gram-dodatnia bakteria należąca do promieniowców. Ten mikroorganizm charakteryzuje się złożonym cyklem życiowym, zawierającym m.in. stadium przypominające wielokomórkowe grzyby, dwa rodzaje grzybni oraz postać spor. Takie zróżnicowanie etapów wzrostu wskazuje, iż bakteria ta posiada bardzo złożony system regulowania procesów życiowych, w tym przede wszystkim replikacji DNA. Badania nad regulacją działania maszynarii replikacyjnej i podziałów komórkowych z zastosowaniem różnych modeli badawczych są wiodącym tematem prowadzonym w zespole Pani Profesor Zakrzewskiej-Czerwińskiej, tak więc Doktorant mógł z niewątpliwą korzyścią dla swojej pracy podjąć bardzo interesujący problem badawczy i zastosować do jego rozwiązania szeroki zakres podejść i nowoczesnej metodologii stosowanych od lat w zespole Pani Promotor.

Prezentowana do oceny rozprawa ma postać monografii, zawierającej 114 stron i składającej się z typowych dla prac eksperymentalnych części, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz spisem treści. Wstęp w zwięzły sposób wprowadza w zagadnienia specyfiki cyklu życiowego *Streptomyces*, oraz wyjaśnia rolę różnych czynników w regulacji inicjacji replikacji DNA. Podkreślić należy, iż dobór tylko istotnych dla pracy wiadomości w tak szerokiej dziedzinie, jaką jest replikacja, świadczy o umiejętności Doktoranta właściwego wykorzystania wiedzy literaturowej. Cel pracy jest sformułowany jasno na tle opisanego dotychczasowego stanu wiedzy i przedstawia pytanie o rolę nietypowego w świecie bakterii zjawiska fosforylacji białka inicjatorowego replikacji DNA, DnaA. Rozdział 3, Materiały i metody, opisuje wyczerpująco stosowane odczynniki wraz z ich miejscem wytworzenia, zastosowaną aparaturę, skład pożywek i buforów - ułatwieniem jest uporządkowanie informacji w formie tabeli, przydatne są także zebrane informacje na temat stosowanych narzędzi bioinformatycznych. Zastosowane w pracy szczepy bakteryjne oraz konstrukty są także opisane dokładnie, zabrakło jedynie informacji o pochodzeniu genu *dnaA* w konstrukcie pET28a DnaA-His. Opis stosowanych metod, łącznie z konstrukcją wektorów i szczepów bakteryjnych jest odpowiednio szczegółowy, aby możliwe było nie tylko dokładne zrozumienie strategii doświadczalnych, ale także skorzystanie z prezentowanej metodologii. Zauważyć należy, iż w pracy zastosowany został szereg zaawansowanych metod inżynierii genetycznej i analiz

biochemicznych i molekularnych białek, a hipotezy były zazwyczaj weryfikowane przy użyciu więcej niż jednego podejścia doświadczalnego. W rozdziale Wyniki zostały zaprezentowane etapy pracy podjęte dla realizacji celu rozprawy, wyróżnione tytułami podrozdziałów. Poszczególne wyniki są zilustrowane fotografiami żeli, blotów, wykresami oraz obrazami mikroskopowymi. Tutaj mam kilka uwag do prezentacji wyników – niektóre ryciny mogłyby być przedstawione w powiększeniu jak np. Ryc. 4.2; byłoby lepiej, gdyby kolory przyporządkowane domenom białka DnaA na rycinie 4.5 odpowiadały tym ze schematu z rys. 1.5; w legendzie do ryciny 4.1 należałoby konsekwentnie stosować określenia ścieżka (zamiast zamiennie z „linia”). W rozdziale Dyskusja przedstawione zostały możliwe interpretacje uzyskanych wyników, także w kontekście dotychczasowej wiedzy; interesująco zaprezentowane zostały hipotezy dotyczące znaczenia procesu fosforylacji DnaA u *S. coelicolor*. Krótkie podsumowanie zamyka przedstawienie wyników rozprawy. Spis literatury pokazuje znajomość aktualnych prac z tematyki regulacji replikacji DNA. Załączniki zamieszczone na końcu pracy ilustrują mapy skonstruowanych plazmidów oraz porównanie sekwencji aminokwasowych domeny III DnaA u różnych gatunków bakterii. Rozprawa napisana jest poprawnym językiem naukowym, zwraca uwagę dbałość o stylistykę, interpunkcję i poprawne budowanie zdań, a także brak wyrażen żargonowych.

Rozprawa podejmuje bardzo ciekawe zagadnienie procesu fosforylacji białka DnaA. Taka modyfikacja białka inicjatorowego procesu replikacji DNA była nieznana i nie opisana do tej pory u organizmów prokariotycznych. Tak więc podjęcie badań nad mechanizmem i rolą tego procesu stanowi o nowatorstwie pracy, a także wnosi nowe informacje dla poznania mechanizmów regulacji rozwoju *Streptomyces coelicolor*. Punktem wyjścia do rozpoczęcia badań były opublikowane dane o fosforylacji DnaA w badaniu fosfoproteomu. Pierwszym etapem pracy było zatem potwierdzenie tej obserwacji oraz próby skorelowania tego procesu z określonym punktem w cyklu życiowym bakterii. Kilka podejść doświadczalnych zakończyło się niepowodzeniem (którego możliwe przyczyny zostały przeanalizowane w rozdziale Dyskusja), a dopiero zastosowanie metody immunoprecypitacji dla izolacji fosforylowanych białek i następnie potwierdzenie obecności puli fosforylowanego DnaA pozwoliło na weryfikację założeń wstępnych projektu. Co ciekawe, obecność fosforylacji DnaA skorelowana była z fazami cyklu życiowego *S. coelicolor* – tymi, w których obserwowana jest aktywność replikacyjna. Ta obserwacja stanowiła ważne i ciekawe odkrycie, a jednocześnie była podstawą do dalszych analiz mechanizmu i znaczenia tego zjawiska. Wcześniejsza identyfikacja reszty aminokwasowej białka

DnaA ulegającej fosforylacji pozwoliła na podjęcie prób skonstruowania mutantów w genie *dnaA*: naśladującego stan fosforylacji oraz niezdolnego do fosforylacji. Możliwe okazało się jedynie wprowadzenie mutacji w drugiej kopii genu *dnaA*, co dodatkowo wskazuje na istotną rolę fosforylacji w regulacji aktywności DnaA. Modelowanie komputerowe (wykonane we współpracy z Uniwersytetem Gdańskim) struktury białek – natywnego oraz ze zmianami w miejscu odpowiedzialnym za fosforylację – wskazuje na możliwą zmianę konformacji białka DnaA przez fosforylację. Uzyskane konstrukty pozwoliły na oczyszczenie odpowiednich białek do badań *in vitro*. Preparatyka opierała się na wykorzystaniu znacznika His – i tu mam pytanie: **czy obecność reszt histydynowych nie mogła być powodem zmian w aktywności białka?** Jak również, chciałam zapytać, **dłaczego w przypadku białka DnaA T486A, którego preparat zawierał dodatkowe białka, nie zastosowano dodatkowego etapu oczyszczania np. na kolumnie z jonami Co.** Oraz, **czy zanieczyszczenia frakcji preparatu T486A nie mogły być przyczyną zmian w widmie dichroizmu kołowego białka.** Charakterystyka białka określanego jako pseudofosforylowane wykazała, iż białko to cechuje się wyższą aktywnością ATPazy oraz zmniejszoną zdolnością do wiązania DNA rejonu *oriC* – wyniki te wskazują, iż fosforylacja jest związana ze zmianami w istotnych aktywnościach białka DnaA podczas replikacji.

Fosforylacja jako element regulacji aktywności białka w komórce jest zazwyczaj przeprowadzana przez specyficzną kinazę, odbierającą określony sygnał. W rozprawie podjęto poszukiwania kinazy odpowiedzialnej za fosforylację DnaA dzięki zastosowaniu mutantów delecyjnych w genach kinaz. W ten sposób zidentyfikowano kinazę AfsK jako białko odpowiedzialne za fosforylację DnaA. Co ciekawe, wykazano, że jedynie nadprodukcja tej kinazy wpływa na lokalizację kompleksów replikacyjnych w strzępkach *S. coelicolor*, zaś jej brak nie powodował zmian w tej lokalizacji. Dlatego, chciałam zapytać, **jakie są efekty fenotypowe delecji genu *afsK*** – czy jest to np. spowolnienie wzrostu czy zmiany w czasie trwania poszczególnych faz rozwoju bakterii. W rozprawie stwierdzono, iż nie zostały przeprowadzone eksperymenty w celu ilościowego określenia stopnia fosforylacji DnaA w cyklu komórkowym – **czy takie badania są planowane, oraz, jakie byłyby możliwości przeprowadzenia takich analiz?**

Rozprawa przedstawia spójne wyniki badań wykazujące po raz pierwszy zjawisko, mechanizm i przypuszczalną rolę fosforylacji DnaA w regulacji replikacji *Streptomyces coelicolor*. Warte podkreślenia jest podjęte ryzyko naukowe, związane z nowatorstwem

koncepcji i podejść eksperymentalnych. Interesujące rezultaty badań przynoszą kolejne wyzwania i pytania, w związku z czym chciałabym poprosić, aby Doktorant przedstawił hipotezę, wyjaśniającą, **dlaczego właśnie *S. coelicolor* ma tak nietypowy sposób regulacji aktywności DnaA oraz czy podobny mechanizm może występować i pełnić analogiczną rolę u innych bakterii, nie tylko promieniowców.**

W podsumowaniu, mogę stwierdzić, iż rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Łebkowskiego wnosi interesujące i ważne informacje o nietypowym procesie regulacji aktywności białka inicjatorowego DnaA poprzez fosforylację. Zaprezentowane w rozprawie badania stanowią istotny wkład w poznanie mechanizmów regulacji replikacji DNA u bakterii charakteryzujących się złożonym cyklem rozwojowym. Zastosowane podejścia doświadczalne i interpretacja wyników wskazują na umiejętności Doktoranta w prowadzeniu badań naukowych, stawianiu pytań i weryfikacji hipotez. Podkreślić należy, iż mimo trudności technicznych i niepowodzeń niektórych badań, cel pracy został osiągnięty poprawnie i kompletnie, co świadczy także o wytrwałości w prowadzeniu linii badawczej, jak i konsekwencji w realizacji zaplanowanych zadań. Ponadto, istotna część wyników prezentowanych w pracy została opublikowana (J. Bacteriol., 2020).

W związku z tym, stwierdzam, iż przedstawione w rozprawie osiągnięcia naukowe spełniają wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami i uzupełnieniami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora. Dlatego zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Łebkowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Z uwagi na ciekawie poprowadzone i opisane badania, podjęte ryzyko naukowe jak i znaczenie wyników prezentowanych w rozprawie, wnioskuję o jej wyróżnienie.

 UNIWERSYTET GDAŃSKI
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Palasz