



Wrocław 10.12.2018

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz

Z-d Mikrobiologii Molekularnej

Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Zabrockiej, pod tytułem „Motywy strukturalne białka TrfA niezbędne do tworzenia kompleksów z DNA.”

Recenzowana praca doktorska została wykonana w Pracowni Biologii Molekularnej, na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego, pod opieką prof. dr hab. Igora Koniecznego. Zespół prof. Koniecznego od wielu lat skupia się na badaniach replikacji plazmidów, dysponuje doskonałym warsztatem badawczym, a wyniki swoich badań publikuje w czasopismach naukowych o najwyższej randze, stanowi zatem doskonałe środowisko naukowe do przeprowadzenia projektu badawczego opisującego replikacyjne białko plazmidowe. **Celem pracy była analiza oddziaływań inicjatorowego białka TrfA odpowiedzialnego za replikację plazmidu RK2 z DNA.** Plazmid RK2 jest ciekawym i istotnym obiektem badawczym ze względu na szeroki zakres gospodarzy obejmujący między innymi bakterie patogenne oraz z uwagi na zdolność do przenoszenia genów oporności antybiotyki. Zrozumienie mechanizmu replikacji plazmidu RK2 może wspomóc opracowanie strategii kontroli jego propagacji, a tym samym zahamować rozprzestrzenianie się antybiotykooporności.

W pracy opisano zestaw analiz biochemicznych mających na celu identyfikację aminokwasów w białku TrfA bezpośrednio zaangażowanych w oddziaływanie z DNA, a tym samym warunkujących aktywność replikacyjną białka. Doktorantka przygotowała szereg wariantów białka z mutacjami punktowymi (wymianami aminokwasów, które jak wcześniej pokazano zaangażowane są w oddziaływanie z DNA) oraz białek skróconych, pozbawionych fragmentu N-końcowego lub fragmentu C-końcowego. Do badania ich aktywności replikacyjnej i oddziaływania z DNA Doktorantka wykorzystwała szeroki zakres komplementarnych metod, obejmujący pomiary wiązania DNA *in vitro* metodą SPR oraz metody detekcji wiązania białek do DNA w komórkach *E. coli*, a także pomiary aktywności replikacyjnej *in vitro*. Przeprowadzone badania wskazały na obecność w białku TrfA dodatkowej domeny wiążącej DNA (WH3), znajdującej się w N-końcowym fragmencie

białka. Ważnym celem badawczym była próba identyfikacji aminokwasów bezpośrednio zaangażowanych w oddziaływanie z DNA (zarówno z fragmentem zawierającym jedną sekwencję iteronu, jak i pięć takich sekwencji). Było to bardzo ambitne zamierzenie i w tym celu Doktorantka wykorzystwała złożoną, wieloetapową procedurę obejmującą sieciowanie kompleksów białko DNA, trawienia DNA i fragmentację białka, a następnie identyfikację miejsc oddziaływania za pomocą spektrometrii mas. Zastosowanie tej metody pozwoliło na identyfikację wcześniej nieznanymi miejsc oddziaływań. Udział nowo zidentyfikowanych aminokwasów w wiązaniu DNA został potwierdzony poprzez przygotowanie nowych wariantów białka z mutacjami punktowymi i badanie ich oddziaływań. Przeprowadzone badania pokazały, że jedna z dwóch zidentyfikowanych reszt aminokwasowych (R347E) zaangażowana jest w oddziaływanie z jednoniciowym DNA, podczas gdy druga (R327E) z dwuniciowym. To bardzo ciekawa obserwacja, która znacznie poszerzyła stan wiedzy na temat oddziaływań białek TrfA z DNA. Przeprowadzone badania niewątpliwie pozwoliły Doktorantce na zrealizowanie celu badawczego. **Za najważniejsze osiągnięcie recenzowanej pracy można uznać wykazanie oddziaływań pomiędzy domeną WH3 i DNA oraz identyfikacja wcześniej nie opisanych reszt aminokwasowych zaangażowanych w bezpośrednie oddziaływanie. Identyfikacja domeny WH3 jest znaczącym doniesieniem, stanowi bowiem pierwszą wzmiankę o udziale trzeciej domeny wiążącej DNA w oddziaływaniu replikacyjnych białek plazmidowych z DNA.**

W dalszej części recenzji skupię się na omówieniu samej rozprawy doktorskiej. Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Rozdział Wstęp przedstawia aktualny stan wiedzy na temat struktur białek inicjujących replikację, budowy regionów inicjacji replikacji oraz mechanizmów inicjacji replikacji u bakterii, Archea i Eukariota. Zaletami tego rozdziału jest szerokie spojrzenie na podstawowy proces komórkowy w trzech domenach życia oraz ujęcie wielu szczegółowych informacji na temat struktur opisywanych białek. Lekturę tego rozdziału ułatwiają dobrze dobrane rysunki. Dzięki temu Wstęp stanowi ciekawe kompendium wiedzy na temat inicjacji replikacji, które z pewnością może być przydatne jako materiał dydaktyczny lub wykorzystane jako materiał do przygotowania pracy przeglądowej.

Cel pracy jest bardzo precyzyjnie i krótko sformułowany. Sformułowanie to jednak pozostawia czytelnikowi wątpliwości dotyczące przesłanek, które skłoniły Doktorantkę do skupienia się na wariantach mutacyjnych białka TrfA, zwłaszcza tych badanych już wcześniej. Można się domyślać, że Doktorantka postanowiła zbadać wcześniej opisane warianty mutacyjne białka za pomocą nowych metod oraz porównać je z wariantami z podwójnymi mutacjami, jednak dokładniejsze nakreślenie celu pracy na tle istniejącego stanu wiedzy byłoby pomocne podczas lektury Wyników i poproszę Doktorantkę o krótką wzmiankę na ten temat podczas publicznej obrony.

Rozdział Materiały i Metody nie budzi zastrzeżeń. Stanowi on dokładne zestawienie stosowanych oligonukleotydów, złożeń chromatograficznych oraz buforów a także innych odczynników, oraz zawiera pełny poprawny opis metod badawczych.

Rozdział Wyniki przedstawia uzyskane wyniki w sposób precyzyjny, czytelny i logiczny. Rysunki są przejrzyste i dobrze opisane. Bardzo przydatne są schematy doświadczeń i tabelaryczne zestawienia wyników, które w znacznym stopniu ułatwiają lekturę tego rozdziału. Z obowiązku recenzenta wspomnę jednak także brakach w rozdziale Wyniki. Jest to brak informacji o masach cząsteczkowych badanych białek oraz o długościach fragmentów DNA używanych w technice SPR i w metodzie sieciowania z białkiem (informacja ta byłaby przydatna pomimo podania sekwencji używanych fragmentów DNA w rozdziale Metody). Lektura rozdziału Wyniki nasunęła mi także kilka pytań, z których wyjaśnienie w czasie publicznej obrony

1. Co było przesłanką do konstrukcji akurat takich mutantów podwójnych, jakie były badane w pracy?
2. Czy rzeczywiście analiza aktywności replikacyjnej mutantów TrfA *in vivo* poprzez pomiar ich wydajności transformacji komórek *E. coli* daje informacje o sile wiązania białka z DNA? Wątpliwość ta pojawia się, gdy weźmie się pod uwagę różnice w wydajności transformacji plazmidem kontrolnym, które mieszczą się w podobnym zakresie, jak różnice w transformacji plazmidem, którego replikacja zależy od TrfA.
3. Jak interpretować różnice w zależności wydajności replikacji *in vitro* od stężenia białka i jak można wytłumaczyć obserwacje, że przy wyższych stężeniach białka wydajność replikacji spada? Dlaczego wydajna replikacja z użyciem wariantów o wzmocnionym wiązaniu do DNA (A171T i E361K) wymagała wyższego stężenia białka niż w przypadku użycia białka typu dzikiego?
4. Czy planowane są dalsze badania obejmujące mutacje reszt aminokwasowych w obrębie domeny WH3?

Praca zakończona jest Dyskusją, która zawiera dojrzałą i ciekawą interpretację uzyskanych Wyników. Doktorantka umiejętnie i z dużą swobodą omawia swoje Wyniki na tle istniejącego stanu wiedzy. W Dyskusji zaproponowano 3 modele przedstawiające oddziaływanie białka TrfA z fragmentem DNA zawierającym 5 iteronów, według dwóch modeli wiązanych jest 6 cząsteczek białka, a według jednego 7. Na koniec chciałabym prosić o zasugerowanie metody weryfikacji poprawności proponowanych modeli i dyskusję, czy możliwe mogłyby być alternatywne, różne sposoby wiązania.

Podsumowując formalną ocenę pracy stwierdzam, że rozprawa napisana jest poprawnym językiem naukowym. Nie dostrzeżono niepoprawnych sformułowań czy zwrotów żargonowych, a pojawiające się błędy interpunkcyjne nie wpływają znacząco na odbiór pracy. Praca jest też starannie przygotowana pod względem edytorskim (znalazłam tylko jedną literówkę, będącą jednocześnie mutacją punktową - w tytule podrozdziału 6.7.1). Warto również zwrócić uwagę na bogatą (blisko 160 pozycji) i umiejętnie dobraną literaturę.

Na zakończenie chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam poziom naukowy pracy, bogaty warsztat badawczy oraz przejrzysty opis uzyskanych wyników. Doktorantka w pełni wykorzystwała możliwości badawcze, jakie dała jej realizacja pracy w zespole prof. Koniecznego i dokonała istotnych obserwacji naukowych, do jakich należy identyfikacja nowej domeny wiążącej DNA w białku TrfA. **Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji Rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i w związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Elżbiety Zabrockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

D. J. Kowalska