



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Boguszeńskiej, pt.

„Analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* w trakcie głodu aminokwasowego”

wykonanej w Zakładzie Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem prof. dr. hab. Igora Koniecznego

Niedobór składników odżywczych stanowi jeden z głównych czynników stresowych, na jakie narażone są bakterie w środowisku naturalnym. Warunki głodu indukują w komórkach istotne zmiany na poziomie genetycznym i fizjologicznym, prowadzące do spowolnienia bądź zahamowania tempa przebiegu wielu procesów komórkowych. Szczególnie istotny jest proces powielania materiału genetycznego, który jest ściśle regulowany i skoordynowany z podziałem komórki oraz wieloma procesami metabolicznymi. Duża zmienność warunków środowiskowych wymaga od bakterii szybkiej reakcji i adaptacji, co odbywa się za pośrednictwem wielopoziomowych, wciąż nie w pełni poznanych mechanizmów regulacyjnych. Analiza procesów zachodzących w bakterii w warunkach niedoboru pokarmu stanowi więc ważny i interesujący kierunek badań mikrobiologicznych, umożliwiając lepsze zrozumienie złożoności funkcjonowania komórki bakteryjnej w jej naturalnym środowisku.

Oceniana praca wpisuje się w ten nurt tematyczny, dotyczy bowiem wewnątrzkomórkowej analizy białek odpowiadających za inicjację replikacji DNA bakterii *Escherichia coli*, w komórkach poddanym warunkom głodu aminokwasowego. Kluczowe w tej pracy było określenie sekwencji zdarzeń zachodzących z udziałem tych białek na poszczególnych etapach odpowiedzi stresowej, tj. przed ekspozycją na czynnik stresowy, w trakcie jego oddziaływania oraz po jego ustąpieniu, kiedy komórka stopniowo powraca do stanu pierwotnej aktywności metabolicznej. Poczynione obserwacje pozwoliły wnioskować o występowaniu nieopisanych wcześniej globalnych mechanizmów regulujących odpowiedź komórki na warunki głodowe, co jest jednym z głównych osiągnięć tej pracy. Ca ważne, badania te nie ograniczały się jedynie do analizy białka DnaA, odpowiedzialnego za inicjację replikacji chromosomu, lecz obejmowały również białko inicjatorowe TrfA modelowego plazmidu RK2. Pozwoliło to na szersze ujęcie analizowanego zjawiska, również z

perspektywy egzogennych replikonów, które stanowią istotny komponent wielu genomów bakteryjnych.

Główny nacisk w badaniach położono na analizę białka DnaA. Pierwszym zadaniem było określenie jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji na różnych etapach odpowiedzi na głód aminokwasowy. Do realizacji tego zadania zaplanowano wykorzystanie fuzyjnego białka DnaA-EYFP, charakteryzującego się zdolnością do fluorescencji. Aby potwierdzić, że białko to wykazuje właściwości charakterystyczne dla DnaA typu dzikiego, DnaA-EYFP-His nadprodukowano w komórkach *E. coli*, a po jego oczyszczeniu przeprowadzono testy *in vitro*, obejmujące analizę porównawczą wybranych właściwości fizykochemicznych białka oraz ocenę jego zdolności do oddziaływania z regionem origin chromosomu (*oriC*).

Moje uwagi do tej części pracy dotyczą nazewnictwa rekombinowanych białek inicjatorowych – w kilku miejscach białko DnaA-EYFP-His nazywane jest DnaA-EYFP, a DnaA-His określone jest jako DnaA typu dzikiego (np. Ryc. 12). Na Rycinie 14, w 1 ścieżce panelu B, brak jest sygnału immunodetekcji DnaA-EYFP, mimo iż białko to było obecne w próbce – proszę o interpretację tego wyniku. Czy w teście EMSA przeprowadzono również kontrolę negatywną z wykorzystaniem fragmentu DNA, z którym nie oddziałuje DnaA?

Następnie, po weryfikacji przydatności algorytmu N2V, umożliwiającego poprawę jakości obrazów w mikroskopii fluorescencyjnej, przeprowadzono finalne badania lokalizacji białka DnaA-EYFP w komórkach *E. coli*, wykorzystując technikę ujęć poklatkowych połączoną z systemem mikroprzepływowym. Analizy długości komórek bakteryjnych, rozmieszczenia foci oraz intensywności fluorescencji wykazały, że w warunkach głodu aminokwasowego dochodzi do zmian morfologii komórek oraz dystrybucji DnaA-EYFP, wskazującej na reorganizację lokalizacji białka inicjatorowego w komórce w odpowiedzi na stres. Obraz ten dopełniły wyniki analiz wewnątrzkomórkowego poziomu białka inicjatorowego, wskazujące na znaczne obniżenie ilości DnaA w warunkach głodu, oraz przebiegu replikacji chromosomowego DNA metodą ilościowego PCR. Badania te przeprowadzono w kolejnych przedziałach czasowych, dzięki czemu uzyskano płynny obraz sekwencji i dynamiki zmian zachodzących w komórkach pod wpływem stresu. Uzyskane wyniki były w zgodzie z wcześniej opublikowanymi danymi, co dodatkowo potwierdziło poprawność układu eksperymentalnego z fuzyjnym białkiem inicjatorowym.

W kolejnym etapie zbadano globalne interakcje białka inicjatorowego z chromosomowym DNA w warunkach głodu aminokwasowego. W tym celu wykorzystano metodę ChIP-seq, co wymagało wcześniejszej optymalizacji poszczególnych etapów procedury oraz weryfikacji jakości uzyskanych prób, a następnie także jakości zgromadzonych danych i ich statystycznej istotności. Ważnym elementem analizy była identyfikacja *in silico* potencjalnych miejsc oddziaływania z DnaA w chromosomie, charakteryzujących się różnym stopniem konserwacji sekwencji, a następnie skorelowanie tych danych z wynikami uzyskanymi metodą ChIP-seq. Jednym z najważniejszych wniosków wynikających z tych badań było wykazanie, że w warunkach głodu aminokwasowego, białko DnaA nie tylko przestaje wiązać się z *oriC*, lecz zmianie ulega ogólny profil jego oddziaływania z DNA. Wskazuje to na istnienie nadrzędnych mechanizmów regulujących aktywność DnaA w

warunkach stresowych lub dostępność miejsc rozpoznawanych przez to białko w genomie. Wnioskowanie to jest tym bardziej uzasadnione, iż eksperymenty kontrolne przeprowadzone z udziałem szczepu *E. coli* Δ *ppk* wykazały, że zaobserwowane zmiany nie wynikały jedynie ze zmniejszonej ilości białka inicjatorowego w komórce.

Szczególnie interesująca była identyfikacja kilku *loci*, z którymi DnaA wchodzi w interakcje wyłącznie w warunkach stresu. Rodzi to szereg pytań dotyczących biologicznego znaczenia tych stresowo-specyficznych oddziaływań: (a) jaka jest przewidywana funkcja zidentyfikowanych genów, (b) czy geny te są zgrupowane w jednym klastrze w genomie, (c) czy występują w potencjalnych operonach (z jakimi genami?), (d) czy dostępne są dane transkryptomiczne dla komórek *E. coli* badanych w warunkach głodu – a jeśli tak, jak zmienia się poziom ekspresji tych genów w odpowiedzi na stres. Doktorantka zbadała *in vitro* interakcje DnaA z jednym ze zidentyfikowanych *loci* (*glpG*). Chociaż wynik testu EMSA jest interpretowany jako pozytywny, niepokoi obecność kompleksów białka z fragmentem DNA stanowiącym kontrolę negatywną (*ter*), widocznych już w obecności 10 pM DnaA. Czy wybór tego genu do testów był podyktowany również obecnością sekwencji DnaA-box o najwyższym/wysokim stopniu zgodności z konsensem? Jaki był stopień zróżnicowania przewidywanych sekwencji DnaA-box w pozostałych genach z tej puli. Z pewnością testy oddziaływania białka inicjatorowego z DNA należałoby w przyszłości rozszerzyć na wszystkie wskazane w badaniach *loci*.

Drugim ważnym wątkiem w badaniach były analizy dotyczące replikacji plazmidu RK2 w warunkach głodu aminokwasowego. Model ten jest szczególnie interesujący, ponieważ w inicjację replikacji plazmidu zaangażowane jest także chromosomowe białko DnaA, co sprawia, że replikacja plazmidu może być „wrażliwa” na zaobserwowane w warunkach głodu fluktuacje poziomu i aktywność DnaA. W istocie, analizy ChIP-seq wykazały obniżenie oddziaływań tego białka z *oriV* plazmidu, analogicznie jak w przypadku białka inicjatorowego TrfA, co łącznie korelowało z zahamowaniem inicjacji replikacji RK2. Dalsze analizy, przeprowadzone przy nadprodukcji w komórkach dzikiego białka TrfA, bądź jego hiperaktywnego, monomerycznego wariantu, ukazały kierunkowe zmiany obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu obu białek w warunkach stresowych. Wyniki te sugerują istotną regulacyjną rolę procesów proteolitycznych aktywowanych w warunkach głodu aminokwasowego, co jest istotne w kontekście biologii plazmidów bakteryjnych.

Opisane w pracy eksperymenty zostały starannie zaplanowane i przeprowadzone z wykorzystaniem odpowiednich kontroli. W badaniach wykorzystano liczne techniki i metody molekularne, metody mikroskopowe oraz bioinformatyczne, z których wiele wymagało optymalizacji oraz standaryzacji na poszczególnych etapach. Dzięki temu Doktorantka zgromadziła dużą ilość rzetelnych danych, których analiza uprawniała do sformułowania przedstawionych w pracy wniosków. Wysoko oceniam zarówno wartość naukową tej pracy, jak i warsztat badawczy Doktorantki, a także Jej rozległą wiedzę specjalistyczną, na co wskazuje rzeczowa i dogłębna dyskusja uzyskanych wyników, przeprowadzona na tle aktualnej wiedzy z zakresu poruszanej tematyki. Szczególnie interesujące były dla mnie rozważania na temat białek NAP i wywoływanej przez nie kondensacji DNA jako czynnika regulacji inicjacji replikacji.

Rozprawa ma klasyczną formę spójnego tematycznie opracowania. Wyróżniono w niej części typowe dla tego typu prac, z podziałem na streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję i literaturę. Dobór treści do wstępu jest odpowiedni, bowiem przybliży czytelnikowi zagadnienia związane zarówno z odpowiedzią *E. coli* na warunki stresowe, jak i z procesami replikacji chromosomowego i plazmidowego DNA. W końcowej części Wstępu Autorka zarysowuje bliżej problematykę badawczą, jaką jest wpływ stresu środowiskowego na replikację DNA, co prowadzi bezpośrednio do postawionego celu pracy. Sam cel został sformułowany niezbyt precyzyjnie („*Celem pracy była analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach E. coli w warunkach głodu aminokwasowego.*”). Analiza nie jest celem samym w sobie lecz drogą do rozwiązania sformułowanego problemu (celu) naukowego. Jedyna moja uwaga dotycząca struktury pracy odnosi się do rozdziału Wyniki, który zawiera trzynaście równocennych podrozdziałów – uważam, że korzystne byłoby pogrupowanie ich i przedstawienie jedynie pięciu głównych podrozdziałów, odpowiadających zadaniom badawczym sprecyzowanym na str. 30 rozprawy (Cel pracy).

Rozprawa została napisana poprawnie, dobrym językiem oraz odpowiednio zilustrowana – zawiera 39 przemyślanych, dobrej jakości rycin. Jako recenzent doceniam również umiejętność dokonania syntezy dużej ilości zgromadzonych danych i przedstawienia ich w zwięzłej i klarownej formie. Niedociągnięć językowych i edytorskich znalazłem stosunkowo niewiele. Wspomnę jedynie o błędnym zapisie oporności na ampicylinę w Tabeli 2 oraz przypomnę, że oporność na antybiotyki determinowana plazmidowo powinna być oznaczana kodem dwu-, a nie trzyliterowym. Te drobne uchybienia nie wpływają na moją wysoce pozytywną ocenę całości rozprawy.

Uważam, że rozprawa ta przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było określenie zmian zachodzących na poziomie białek inicjatorowych oraz inicjacji replikacji DNA w komórkach *E. coli* na różnych etapach stresu spowodowanego głodem aminokwasowym. Uzyskane wyniki wskazują na wielopłaszczyznowy charakter zmian prowadzących do zahamowania inicjacji replikacji DNA w tych warunkach. Zmiany te obejmują obniżenie poziomu DnaA w komórce, jego acetylację, zmianę wewnątrzkomórkowej lokalizacji oraz profilu oddziaływań z DNA, a w kontekście RK2 także proteolityczną degradację białka TrfA. Obserwacje te pozwalają wnioskować o istnieniu nieopisanych wcześniej mechanizmów pomagających bakterii przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiska, co otwiera nowe perspektywy i wskazuje kierunki przyszłych badań.

Wniosek końcowy

W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym, zwracam się do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Boguszewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia.

Biorąc pod uwagę dużą wartość naukową tej pracy oraz opublikowanie części jej wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

