

Łódź, 14 listopada 2025

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Eweliny Boguszewskiej pt. „Analiza Białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* w trakcie głodu aminokwasowego”.

O sukcesie mikroorganizmów w zmiennych warunkach środowiska decyduje ich zdolność adaptacji, w tym zdolność precyzyjnej kontroli inicjacji procesu replikacji, dostosowanego do możliwości metabolicznych komórki. Znaczące spowolnienie replikacji w warunkach niekorzystnych oraz wzmożenie tego procesu w warunkach sprzyjających jest kluczową strategią zarówno organizmów środowiskowych, komensalnych jak i groźnych bakteryjnych patogenów. Spowolnienie metabolizmu, w tym znaczące spowolnienie procesu inicjacji replikacji DNA, jest procesem pozwalającym nie tylko na właściwe gospodarowanie dostępnymi zasobami, ale także w przypadku bakteryjnych patogenów, zwiększenie tolerancji na leki czy też uniknięcie mechanizmów odpornościowych gospodarza. Precyzyjne, wielopoziomowe mechanizmy kontroli inicjacji procesu replikacji stanowią więc o zdolności bakterii do przeżycia i możliwości adaptacji w różnych środowiskach. Proces replikacji, w tym etap inicjacji, był intensywnie badany, szczególnie dla organizmów modelowych takich jak pałeczka okrężnicy, wciąż jednak wiedza ta jest niewystarczająca szczególnie dla warunków stresu, w tym warunków głodu aminokwasowego. Doktorantka podjęła się trudu uzupełnienia naszej wiedzy w tym zakresie wykorzystując w tym celu modelowy szczep *E. coli* oraz, w głęboko przemyślanych i świetnie zaplanowanych badaniach, stosując szereg zaawansowanych technik z zakresu mikrobiologii, biochemii i genetyki. Opieka Promotorska prof. Igora Koniecznego gwarantowała świetny poziom merytoryczny i doskonałą jakość naukową realizowanych badań.

Układ tekstu przedstawionej do recenzji dysertacji jest typowy dla prac eksperymentalnych. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym napisanym bardzo ładnym językiem naukowym, przedstawiającym aktualną wiedzę w zakresie odpowiedzi komórki na stres, kontroli inicjacji replikacji chromosomalnego DNA w warunkach optymalnych a także inicjacji replikacji plazmidu RK2 w komórkach *E. coli*. Następnie ze względu na temat badań własnych Doktorantka przedstawia dostępne dane dotyczące wpływu stresu środowiskowego na inicjację replikacji chromosomalnego oraz plazmidowego DNA. W tej bardzo dobrze napisanej części pracy zabrakło mi jedynie wskazania, które z opisywanych mechanizmów regulujących proces inicjacji replikacji są uniwersalne w świecie bakterii a które mogą być pomijane lub zastępowane u dalszych filogenetycznie gatunków, np. u bakterii Gram-dodatnich **i prosiłbym Doktorantkę o zwięzłe uzupełnienie tych informacji podczas publicznej obrony.**

Zarówno główny cel pracy jaki i cele szczegółowe, które zostały postawione przed Doktorantką sformułowano w sposób precyzyjny a zaplanowane badania zmierzały do ich pełnej realizacji.

W rozdziałach Materiały oraz Metody, Autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje bogactwo metod mikrobiologicznych oraz biochemicznych zastosowanych dla realizacji celów pracy, szczególnie biorąc pod uwagę konieczność optymalizacji szeregu z nich co niewątpliwie stanowiło odrębne, czasochłonne zadania badawcze.

Poszczególne etapy pracy przedstawione w rozdziale Wyniki zostały dogłębnie przemyślane i skrupulatnie zrealizowane. Celem pierwszej części realizowanych przez Doktorantkę badań było określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka DnaA przed, w trakcie i po stresie z zastosowaniem mikroskopii pokłatkowej oraz rekombinowanego szczepu z ekspresją zmodyfikowanego genu *dnaA-eyfp*. Właściwy eksperyment został poprzedzony weryfikacją funkcjonalności tak zmodyfikowanego białka DnaA zarówno na poziomie komórkowym (replikacja DNA, podziały komórkowe) jak i na poziomie molekularnym, in vitro, poprzez porównanie jego zdolności wiązania *oriC*, czy określenie profilu topnienia w porównaniu do białka typu dzikiego. Analizując bardzo klarowne i precyzyjnie opisane wyniki Doktorantki zastanawiam się tylko czy wykorzystywane w badaniach białko rekombinowane

DnaA-eYFP wykazuje również identyczną jak białko natywne siłę wiązania do sekwencji DnaA-box oraz niezmienną dynamikę tworzenia kompleksów na *oriC* (działanie kooperatywne). **Proszę Doktorantkę o komentarz.** Przeprowadzenie badań lokalizacji białka DnaA-eYFP w komórkach bakteryjnych z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej połączonej z techniką ujęć poklatkowych w sposób jednoznaczny i obrazowy pokazały zahamowanie procesu replikacji DNA podczas stresu poprzez zahamowanie inicjacji kolejnych rund replikacyjnych. Ważnym etapem badań było zbadanie wpływu głodu aminokwasowego na wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA ocenianego metodą western blot. W tym miejscu mam drobne wątpliwości metodyczne ze względu na brak w przeprowadzonym eksperymencie białka kontrolnego o stałym poziomie ekspresji. Rozumiem, że żadne z potencjalnych białek kontrolnych nie wykazywało wystarczająco stabilnej ekspresji w badanych warunkach, **ciekawym jestem jednak jakie białka Doktorantka rozpatrywała jako potencjalne białka kontrolne i czy decyzja była podjęta na podstawie eksperymentów kontrolnych czy na podstawie literatury?** Zastanawia mnie także, że ilość nanoszonego materiału określano na podstawie wartości optycznej OD600 a nie liczby komórek (np. CFU) mimo, że w warunkach stresu komórki były krótsze co wpływa na wartość OD. Mimo tych uwag nie mam wątpliwości, że ilość białka DnaA podczas stresu ulega znaczącej redukcji co może wpływać na zahamowanie procesu inicjacji replikacji DNA co zostało potwierdzone przez Doktorantkę w analizie qPCR na podstawie oceny ilościowej *oriC*. Niezwykle cennym eksperymentem przeprowadzonym przez Doktorantkę uzupełniającym powyżej omówione obserwacje była immunoprecypitacja chromatyny z wykorzystaniem sieciowania kompleksów nukleoproteinowych. Po zoptymalizowaniu warunków eksperymentu Doktorantka jednoznacznie wykazała preferencyjne wiązanie białka DnaA do *oriC* oraz 31 innych regionów chromosomu przed i po stresie, oraz 6 regionów DNA wiązanych przez DnaA specyficznie podczas stresu, w warunkach w których nastąpiło zahamowanie wiązania DnaA do *oriC*. Przeprowadzone analizy ChIPSeq oraz badania rozmieszczenia sekwencji DnaA-box w chromosomalnym DNA jednoznacznie wykazały, że w warunkach głodu aminokwasowego następuje zmiana profilu oddziaływania DnaA z chromosomalnym DNA co prowadzi m.in. do braku wiązania DnaA do regionu *oriC* mimo obecności licznych perfekcyjnych DNA-box. Z analiz Doktorantki wnioskuję, że zmiana profilu wiązania chromosomalnego DNA przez DnaA podczas stresu nie wynika z liczby, czy sekwencji DnaA-box a raczej z innych czynników, jak choćby ich dostępność wynikająca ze zmian w

topologii określonych domen chromosomu. Ciekawy jestem czy Doktorantka próbowała analizować otoczenie sekwencji DnaA box wiązanych przed, po i podczas stresu, pod kątem średniej zawartości GC% oraz czy miejsca wiązania DnaA specyficzne dla stresu znajdują się w jednym obszarze chromosomalnego DNA, które mogłoby potencjalnie występować w jednej domenie, o określonym stopniu superskręcenia? Czy rozważała Doktorantka zbadanie wiązania białka DnaA do *oriC* wprowadzonego w obręb plazmidowego DNA w warunkach stresu w celu porównania z wiązaniem DnaA do natywnej sekwencji *oriC*? Ciekawy też jestem jaki poziom nadprodukcji białka DnaA w warunkach stresu, doprowadziłby do przywrócenia jego zdolności wiązanie w regionie *oriC*, i czy w tych warunkach nadal wiązane byłyby sekwencje DnaA-box specyficzne dla stresu, choć na to pytanie oczywiście, przynajmniej częściowo, odpowiadają doświadczenia Doktorantki ze szczepem *Δppk*. Bardzo doceniam dalsze dociekania Doktorantki zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów obserwowanego zahamowania wiązania DnaA do *oriC* w warunkach stresu i włączenie do badań szczepu defektywnego w syntezie funkcjonalnego białka Fis czy też skupienie się na acetylacji DnaA. Doktorantka pokazała zależność pomiędzy poziomem acetylacji DnaA a stresem co jednak nie tłumaczy zmiany profilu wiązanych sekwencji DnaA-box przed, w trakcie i po stresie. Ciekawym uzupełnieniem badań Doktorantki było zbadanie oddziaływań białka TrfA z *oriV* na modelu plazmidu RK2, gdzie obserwowano podobne zależności jak wcześniej dla układu chromosomalnego.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.

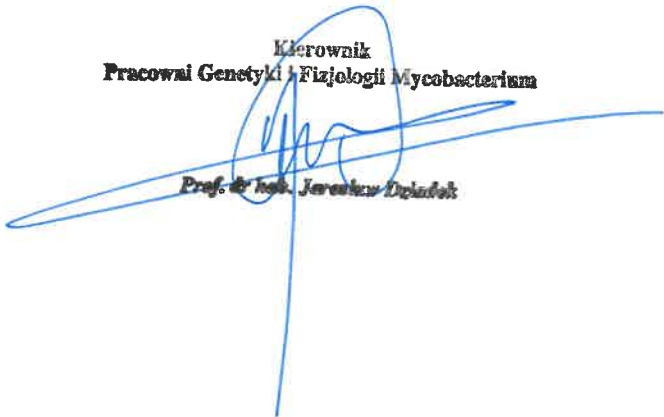
W strukturze pracy zabrakło mi natomiast wydzielonego rozdziału Wnioski, gdzie czytelnik mógłby zapoznać się z przemyśleniami Doktorantki co do jednoznacznych ustaleń wynikających z przeprowadzonych badań oraz tych, które wymagają jeszcze dalszych weryfikacji eksperymentalnych.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Eweliny Boguszewskiej uważam, że Doktorantka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną niezbędną dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie biotechnologia, wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej a przedstawiona do oceny

dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia kryteria zawarte w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Boguszewskiej do dalszych etapów postępowania.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jerzy Dziadek