



Łódź, 4 listopada 2024

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Sroki pt. „The role of inorganic polyphosphate in the regulation of *Escherichia coli* CobB deacetylase activity during amino acid starvation”.

O możliwości zasiedlania przez drobnoustroje szeregu niszy ekologicznych decyduje ich zdolność do adaptacji, a także odpowiedzi na stres, wywołany niedoborem składników odżywczych, uszkodzeniami DNA, niedoborem tlenu itp. W przypadku bakterii chorobotwórczych zdolności odpowiedzi na stres są często kluczowe dla procesu wirulencji i związanej z nim zdolnością do przeżywania w organizmie gospodarza. Wydawałoby się, że wiele z mechanizmów odpowiedzi na stres u bakterii jest już bardzo dobrze poznana, szczególnie w modelowym organizmie jakim od lat w badaniach mikrobiologicznych jest pałeczka okrężnicy. Okazuje się jednak, że procesy odpowiedzi na stres są na tyle złożone i wieloetapowe, że wciąż poznajemy nowe mechanizmy, białka czy też inne molekuly, które pozwalają bakteriom na regulację podstawowych procesów metabolicznych w zależności od zmieniających się warunków środowiska. Świetnym przykładem odkrywania nowych mechanizmów kontrolnych w zdawałoby się bardzo dobrze poznanych procesach metabolicznych u *E. coli* jest przedstawiona do recenzji praca Doktorantki, która w bardzo dobrze zaplanowanych i zrealizowanych eksperymentach, wykorzystując szereg technik z zakresu mikrobiologii, biochemii i genetyki, zgłębia rolę nieorganicznych polifosforanów w regulacji inicjacji procesu replikacji, poprzez kontrolę deacetylacji białka DnaA. Biorąc pod uwagę dorobek naukowy promotora pracy prof. Igora Koniecznego świadczący o świetnym warsztacie naukowym kierowanego przez niego zespołu, należało się spodziewać nie tylko postawienia przed Doktorantką ambitnego celu badań, ale również jego realizacji z zastosowaniem wyszukanych,



precyzyjnych technik badawczych. Miło mi poinformować po lekturze dysertacji, że moje oczekiwania w tym zakresie zostały w pełni zaspokojone.

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 na temat odpowiedzi stresowej bakterii ze szczególnym uwzględnieniem odpowiedzi ścisłej i roli w tym procesie alarmonów tetra- i penta-fosforanu guanozyny. Następnie ze względu na temat badań własnych Doktorantka przedstawia rolę nieorganicznych polifosforanów syntetyzowanych przez komórki bakterii w ramach odpowiedzi ścisłej, proces ich syntezy, degradacji, poznaną lub przewidywaną rolę w metabolizmie. Ponadto Doktorantka opisuje proces regulacji replikacji DNA w warunkach normalnych oraz pod działaniem stresu a także proces acetylacji białek. W tej bardzo dobrze napisanej części pracy zabrakło mi jedynie trochę szerszego opisu mechanizmu regulującego proces akumulacji PolyP, aczkolwiek Doktorantka zacytowała niezbędną w tym temacie literaturę.

Cel pracy jaki został postawiony przed Doktorantką został sformułowany w sposób precyzyjny a przeprowadzone doświadczenia zmierzały do jego 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 przedstawienie zindywidualizowanych protokołów wykorzystanych do ekspresji oraz oczyszczania rekombinowanych i natywnych białek, wskazujących na zdobyte przez Panią Magdalenę w czasie realizacji doktoratu ogromne doświadczenie w tym zakresie. Zastosowana preparatyka dla poszczególnych białek opierała się o jedno lub kilkietapowy proces oczyszczania, **ciekawym jest, które z uzyskanych białek było największym wyzwaniem dla Doktorantki, w jaki sposób oceniała czystość uzyskanych preparatów oraz jakie parametry musiały spełniać białka aby preparatyka mogła zostać uznana za zoptymalizowaną?**

Poszczególne etapy pracy przedstawione w rozdziale Wyniki zostały dogłębnie przemyślane i skrupulatnie zrealizowane. Jednym z głównych zadań Doktorantki była identyfikacja białek wiążących nieorganiczne polifosforany, a zadanie to stanowiące główny cel badań zrealizowano przy zastosowaniu dwóch niezależnych podejść metodycznych, poprzez



„wyłapywanie” białek na związany ze złożem nieorganiczny polifosforan oraz „wyłapywanie” PolyP wraz ze związanymi białkami do rekombinowanej domeny PPBD białka PPX. Obie te metody przeprowadzono dla komórek *E. coli* oraz mutantu pozbawionego zdolności do syntezy PolyP, pozwalały na identyfikację białek wiążących PolyP. Każdą z ww. metod zastosowano jednak dla komórek znajdujących się w innych warunkach wzrostu, w fazie logarytmicznej na bogatym podłożu lub po przeniesieniu komórek do podłoża minimalnego w celu aktywacji odpowiedzi ścisłej. Po zastosowaniu LC MS/MS, pierwsza z metod pozwoliła na identyfikację 658 białek z czego 409 to białka unikalne dla szczepu dzikiego, druga natomiast 98 przy czym 21 uznano jako obiecujący kandydaci do dalszych analiz. Należy podkreślić, że przeprowadzenie drugiej z opisanych procedur wiązało się z koniecznością weryfikacji zdolności domeny PPBD do wiązania PolyP, oraz DNA, co zostało przeprowadzone poprzez barwienia jak i ocenę siły wiązania z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu magnetycznego (SPR). Zbiory zidentyfikowanych białek wiążących PolyP były rozbieżne w obu przeprowadzonych procedurach, co jednak nie dziwi ze względu na odmienne warunki wzrostu komórek, z których pozyskiwano lizaty białkowe. Biorąc pod uwagę czułość metody LC MS/MS nie dziwi także duża liczba białek zidentyfikowana w kontroli negatywnej, szczepie mutancie Δppk . Ciekawy jestem czy Doktorantka nie rozważała zastosowania w analizie wyników z LC MS/MS metod półilościowych, bezznacznikowych, które pozwoliłyby na ocenę wzbogacenia próbki badanej poprzez analizę intensywności sygnałów peptydów w stosunku do próbki kontrolnej (np. MaxQuant, gdzie intensywność sygnału jest proporcjonalna do ilości obecnego peptydu, co z kolei odpowiada ilości białka w próbce, DOI 10.1002/pmic.201400449). **Proszę o komentarz Doktorantki dotyczący celowości zastosowania takiej analizy w swoich badaniach.**

W dalszej części pracy Doktorantka skupiła swoje badania na jednym z białek (CobB) zidentyfikowanych jako wiążące PolyP. Otrzymane zostały dwie izoformy tego białka, z których dłuższa zawierała dodatkową N-terminalną helisę. Doktorantka wykazała wiązanie wyłącznie dłuższej formy białka CobB z PolyP oraz DNA i określiła siłę tego wiązania. Następnie uzyskała rekombinowane proteazy *E. coli* i wykazała brak wrażliwości obu izoform CobB na ich działanie w warunkach *in vitro*, obserwując natomiast zwiększenie ilości CobB w czasie po indukcji odpowiedzi ścisłej w szczepie dzikim i obniżenie ilości CobB w mutancie Δppk . Wydaje mi się, że w eksperymencie, którego wyniki zaprezentowano na Fig. 34 warto byłoby również sprawdzić poziom białka kontrolnego, nie wiążącego polyP, oraz ocenić całkowitą ilość białka



izolowanego z badanych komórek w czasie. Pozwoliłoby to zbadać na ile zmiany ilościowe CobB-L/S wynikają z PolyP zależnej degradacji, a na ile z ogólnych zmian metabolizmu badanych komórek. Ciekawy jestem też czy Pani Magdalena rozważała przeprowadzenie tego eksperymentu w warunkach zahamowania procesu biosyntezy białka z wykorzystaniem antybiotyków aby wyeliminować efekt syntezy de novo. **Proszę Doktorantkę o komentarz na ten temat.** Bardzo interesującą częścią pracy było zbadanie przez Doktorantkę wpływu PolyP na deacetylację DnaA oraz DnaK. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wiązanie PolyP z CobB lub bezpośrednio z substratem (DnaA) hamuje proces deacetylacji czego konsekwencją jest brak inicjacji nowych rund replikacyjnych w czasie odpowiedzi ścisłej oraz natychmiastowe uruchomienie tego procesu po degradacji PolyP. Pokazanie tego mechanizmu (Fig. 46) jest niewątpliwym wkładem Doktorantki w lepsze zrozumienie procesu regulującego inicjację jednego z podstawowych procesów komórkowych w warunkach stresu.

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

Wnioski przedstawione na str. 91 są w pełni uzasadnione i podparte zaprezentowanymi przez Doktorantkę wynikami badań własnych.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Magdaleny Sroki 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 Magdaleny Sroki do dalszych etapów postępowania.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jeronim Dziadek