



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

dziekanat.wb@uwr.edu.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl

Wrocław 09.11.2024

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz

Z-d Mikrobiologii Molekularnej

Uniwersytet Wrocławski

dagmara.jakimowicz@uwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Sroki pod tytułem „*The role of inorganic polyphosphate in the regulation of Escherichia coli CobB deacetylase activity during amino acid starvation.*”

Recenzowana rozprawa doktorska została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką profesora Igora Koniecznego. Praca doktorska Magdaleny Sroki dotyczy roli polifosforanu w regulacji metabolizmu i cyklu życiowego bakterii. Rola polimeru reszt fosforanowych pozostaje zagadnieniem bardzo słabo poznanym, a jego oddziaływanie z białkami i wpływ na ich aktywność jest szczególnie intrygujące. A zatem tematyka pracy jest oryginalna i ciekawa.

Najważniejsze osiągnięcia Doktorantki w ramach pracy doktorskiej, to opracowanie metody izolacji białek oddziałujących z nieorganicznym polifosforanem u bakterii *Escherichia coli*, identyfikacja białek wiążących polifosforan oraz zbadanie wpływu tego wiązania na aktywność jednego ze zidentyfikowanych białek – deacetylazy CobB. Przeprowadzone badania wykazały, że wiązanie długiej izoformy deacetylazy CobB do polifosforanu hamuje deacetylację białka DnaA (inicjatora replikacji, również wiążącego polifosforan, jak wykazano wcześniej) oraz białka DnaK (białka szoku cieplnego). Doktorantka zbadła też wpływ eliminacji CobB na powrót bakterii do normalnego wzrostu po warunkach stresowych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka zaproponowała nowy model regulacji replikacji chromosomu oparty o deacetylację DnaA przez CobB po uwolnieniu obu białek z



polifosforanu. Mechanizm ten pozwala na przywrócenie replikacji chromosomu po ustąpieniu warunków stresowych.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i składa się z następujących głównych podrozdziałów: Wstęp, Materiały, Metody, Wyniki i Dyskusja, oraz dodatkowo zawiera Cel pracy, listę skrótów oraz wnioski końcowe zakończone przedstawieniem dalszych perspektyw badawczych, a także wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca napisana jest w języku angielskim, na uznanie zasługuje zwięzłość i precyzja wypowiedzi.

Wstęp jest starannie skonstruowany. Informacje przedstawione we Wstępie zostały dobrane w tak, aby rozdział ten wprowadzał czytelnika w tematykę badań. Doktorantka przedstawia kolejno mechanizmy odpowiedzi bakterii na stres, skupiając się na szczególnie na odpowiedzi ścisłej, następnie przechodzi do akumulacji polifosforanu w czasie stresu oraz regulacji replikacji chromosomu w zależności od warunków środowiskowych, po czym omawia acetylację białek. Na uznanie zasługuje umiejętne połączenie poszczególnych podrozdziałów.

Cel pracy jest bardzo precyzyjnie sformułowany. Rozdział Materiały to poprawne zestawienie stosowanych szczepów, plazmidów, przeciwciał. Jedyna informacja, jakiej nie mogłam się doszukać to źródło polifosforanu. Opis metod zawiera, oprócz podstawowych metod analizy białek i analiz oddziaływania białko-DNA/polifosforan, także szczegółowy opis procedur oczyszczania białek używanych w pracy. Opis ten jest kompletny, z jednym zastrzeżeniem – zabrakło informacji o stężeniach końcowych stosowanych induktorów (IPTG i arabinozy, np. str. 36 i 37). Pomocne byłoby także wyraźne określenie metki i typu chromatografii wykorzystanej dla oczyszczenia każdego z białek.

Wyniki uzyskane w ramach pracy opisano na 36 stronach. Doktorantka przedstawiła strategię optymalizacji procedury izolacji białek oddziałujących z polifosforanem, a następnie weryfikację wiązania do polifosforanu dwóch izoform deacetylazy CobB. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka opisała wpływ polifosforanu na aktywność CobB w deacetylacji dwóch różnych substratów: DnaA i DnaK. Kolejno, w rozdziale Wyniki przedstawiono badania podatności CobB na proteolizę oraz wpływ CobB na reaktywację wzrostu po warunkach stresowych a także analizy oddziaływanie acetylowanego DnaA z polifosforanem. Rozdział Wyniki stanowi dopracowaną logiczną całość. Doktorantka prowadzi czytelnika przez kolejne eksperymenty, wyjaśniając ich zasadność, wyciągając wnioski z uzyskanych wyników, co skłania ją do postawienia kolejnych pytań badawczych i zaproponowania kolejnych podejść eksperymentalnych. Dzięki temu, pomimo złożoności problemu, rozdział Wyniki czyta się

bardzo dobrze. Należy też pokreślić, że Doktorantka starannie opisała stosowane kontrole i krytycznie przeanalizowała wszystkie organicznie przeprowadzonych eksperymentów, takich jak np. agregacja używanego białka. Docenić należy także klarowność rysunków, często opatrzonych czytelnymi schematami eksperymentu.

Rozdział Dyskusja stanowi krytyczną analizę uzyskanych wyników w kontekście badań przeprowadzonych dla innych bakterii. Doktorantka rozważa różnice pomiędzy zidentyfikowanymi białkami wiążącymi polifosforan, analizuje rolę dwóch izoform białka CobB i skupia się na regulacji DnaA. Doktorantka wplata w dyskusję dalsze pytania badawcze i opisuje problemy wymagające wyjaśnienia. Z całą pewnością lektura tego rozdziału przekonuje o głębokiej analizie uzyskanych wyników. Praca doktorska została przygotowana w oparciu o blisko 200 pozycji literaturowych co świadczy o doskonałym zapoznaniu z literaturą.

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska pani Magdaleny Sroki jest bardzo dobrze napisana i odpowiednio ilustrowana. Z obowiązku recenzenta przedstawiam jednak kilka pytań, komentarzy i uwag, które nasunęły mi się podczas lektury:

- W rozdziale Wstęp przy omawianiu mechanizmu odpowiedzi na głód aminokwasowy Doktorantka nie wspomniała o roli alternatywnych czynników sigma. Chciałabym poprosić o wzmiankę na ten temat podczas obrony.

- Również w rozdziale Wstęp (strona 19) wspomniano sekwestrację *oriC* zależną od metylacji, jednak zabrakło informacji u jakich bakterii zaobserwowano to zjawisko, przez co można wnioskować, że jest to zjawisko powszechne.

Pytania dotyczące rozdziału Wyniki:

- analizując rysunek 16, który przedstawia badanie poziomu polifosforanu oparte o hydrolizę enzymatyczną, nasuwa się pytanie, czy i w jaki sposób sprawdzano skuteczność hydrolizy polifosforanu,

- niektóre z białek oczyszczano jako fuzję z SUMO lub/i z His-tagiem. W pracy jednak nie podano jaka fuzja była stosowana i w opisie białek fuzyjnych informacja o metce nie jest podana,

- jakie długie były cząsteczki polifosforanu używane do eksperymentów mających na celu zbadanie oddziaływanie polifosforanu z białkami i jakie było ich źródło?

- Doktorantka rozważała hipotezę, że polifosforan mógłby przechwytywać białka wiążące DNA i konkurować z chromosomem o wiązanie tych białek. Czy są podstawy by przypuszczać, że skuteczność takiego przechwytywania mogłoby być uzależniona nie tylko od stężenia

polifosforanu w komórce, ale także od topologii DNA. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować sposób, w jaki można by to zbadać?

- W eksperymencie identyfikacji białek wiążących polifosforan (strona 60) z wykorzystaniem szczepu dzikiego zidentyfikowano 98 białek, natomiast w szczepie kontrolnym było ich 91. Tymczasem Doktorantka wspomina o 21 białkach, które zidentyfikowano w szczepie produkującym polifosforan. Skąd ta liczba?

- W Wynikach nieco mimochodem wspomniano o wpływie fuzji SUMO na funkcjonalności CobB – poproszę o szersze wyjaśnienie na ten temat,

- rysunek 39 przedstawia DnaK z *M. tuberculosis*, nasuwa to pytanie, dlaczego nie pokazano białka z *E coli*?

Należy podkreślić, że praca doktorska Pani mgr Magdaleny Sroki jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i nie dostrzegłam istotnych błędów redakcyjnych. Jedyne drobne uwagi dotyczące redakcyjnej strony pracy to: lista skrótów nie zawiera wszystkich skrótów używanych w pracy, np RNP i RNAP używanych na stronie 13, czy GITC na stronie 44, na rysunku 24 brakuje wyjaśnienia ścieżki oznaczone (-) n, na stronie 63 zabrakło informacji o starterach użytych w reakcji amplifikacji. Chciałabym zaznaczyć, że wymienione powyżej uwagi i pytania nie wpływają na bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Sroki.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Magdaleny Sroki wnosi istotny wkład w poznanie roli polifosforanu w regulacji aktywności białek bakteryjnych. Uznanie budzi sposób opracowanie eksperymentu izolacji białek wiążących polifosforan, weryfikacja zidentyfikowanych oddziaływań oraz krytyczne przeanalizowanie uzyskanych wyników. Doktorantka uzyskała cenne wyniki, które pozwoliły na zaproponowanie nowego modelu regulacji replikacji chromosomu, poprzez regulację aktywności białka DnaA. **Uważam zatem, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Sroki stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i jasno wskazuje, że Doktorantka nabyła wiedzę teoretyczną w tematyce rozprawy oraz umiejętności prowadzenia pracy naukowej.** Biorąc powyższe pod uwagę, potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sroki spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w artykuale 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Sroki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

