



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej CNBCh
dr hab. Agata Krawczyk-Balska
email: a.krawczyk-bal@uw.edu.pl



Warszawa, 25.11.2024 r.

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

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sroki została wykonana pod opieką Pana prof. dr hab. Igora Koniecznego w Zakładzie Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Rozprawa ma formę monografii przygotowanej w języku angielskim. Zawiera wszystkie treści niezbędne do jej rzetelnej oceny w kontekście wymogów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce jako niezbędnych do nadania stopnia doktora.

1. Czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny biotechnologia?

Nieorganiczny polifosforan (PolyP) odgrywa ważną rolę w regulacji szeregu procesów fizjologicznych w odpowiedzi na stres komórkowy i warunki głodu aminokwasowego w komórkach bakterii. Uważa się, że mechanizm działania PolyP jest związany ze zdolnością tego związku do interakcji ze specyficznymi białkami. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że PolyP w warunkach stresowych jest zaangażowany w regulację podstawowych procesów biologicznych takich jak translacja, replikacja DNA chromosomowego i podziały komórek bakterii. Chociaż istotne znaczenie polyP dla przetrwania bakterii w warunkach stresowych jest znane od kilku dekad, molekularne mechanizmy leżące u podstaw regulowanych przez PolyP procesów nie są jeszcze dobrze poznane. Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sroki przedstawia wyniki badań zmierzające do zdefiniowania proteomu granuli tworzonych przez nieorganiczny polifosforan (PolyPomu) w *Escherichia coli* i wyjaśnienia molekularnych mechanizmów regulacji procesu replikacji przy udziale PolyP w komórkach bakterii. Zrozumienie mechanizmów regulacyjnych zachodzących przy udziale PolyP w komórkach bakteryjnych poddanych stresowi może mieć fundamentalne znaczenie dla rozwoju nowych strategii walki z bakteriami patogennymi i w konsekwencji doprowadzić do opracowania nowych farmaceutyków o działaniu antybakteryjnym. Jest to zadanie szczególnie istotne w dobie malejącej skuteczności antybiotyków w leczeniu infekcji bakteryjnych.

Podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących wyjaśnienia molekularnych mechanizmów regulacji procesu replikacji przy udziale PolyP w komórkach bakterii jest zatem uzasadnione i istotne z punktu widzenia rozwoju dyscypliny biotechnologia.

2. Czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie biotechnologia?

Po zapoznaniu się z rozprawą, w szczególności na podstawie rozdziałów „Wstęp” i „Dyskusja” uważam, że Doktorantka przedstawiła wyczerpująco aktualny stan wiedzy dotyczący tematyki pracy. W rozdziale „Wstęp” Doktorantka szczegółowo omówiła zagadnienia dotyczące PolyP, tj. budowę, rolę, proces syntezy i degradacji z uwzględnieniem czynników zaangażowanych w te procesy, a także mechanizmy działania PolyP w odpowiedzi na stres. Doktorantka przedstawiła również regulację procesu replikacji DNA chromosomowego w komórkach bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji aktywności białka DnaA będącego inicjatorem procesu replikacji. Doktorantka scharakteryzowała również proces acetylacji białek bakteryjnych i umiejętnie połączyła zagadnienia dotyczące acetylacji i polyP z procesem replikacji, wskazując w jaki sposób wpływają one na aktywność białka DnaA. Przedstawione we „Wstępie” informacje są bardzo dobrym wprowadzeniem do szczegółowych badań przedstawionych w dalszej części pracy doktorskiej. Warto też zauważyć, że „Wstęp” w sposób logiczny prowadzi do postawionych celów pracy. W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka przeprowadziła wnikliwą i krytyczną dyskusję wyników uzyskanych w pracy na tle dotychczasowych doniesień literaturowych (uwzględniając aspekty metodyczne, biochemiczne i mikrobiologiczne swoich osiągnięć). Piśmiennictwo cytowane w pracy jest prawidłowo dobrane do przedstawienia wiedzy teoretycznej, wyników oraz dyskusji. Odpowiedni dobór technik badawczych wskazują na dobrą orientację Doktorantki w zakresie merytorycznych i metodycznych aspektów prowadzonych badań. Doktorantka w rozprawie posługuje się poprawnym językiem naukowym.

Podsumowując, w mojej opinii rozprawa doktorska świadczy o dobrej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w dyscyplinie biotechnologia.

2. Czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę?

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sroki przedstawia wyniki uzyskane w trakcie prowadzenia szerokiego zakresu prac badawczych. Doktorantka wykonała badania wymagające dużej wiedzy teoretycznej z zakresu biologii molekularnej, biochemii i mikrobiologii oraz opanowania stosowanych technik badawczych. Spośród opisanych w pracy badań jedynie analiza spektrometrii mass została wykonana poza macierzystym Zakładem Biologii Molekularnej UG i GUMed. Rola Doktorantki w analizie wyników spektrometrii mass wymaga doprecyzowania. Warto wyjaśnić czy Doktorantka przeprowadziła analizę i interpretację danych uzyskanych w tych eksperymentach, czy jedynie przekazała próbki do badań i opisała wyniki w rozprawie. Prace wykonane przez Doktorantkę w celu zoptymalizowania procesu izolacji białek związanych z polyP *in vivo* świadczą o jej metodycznym podejściu do prowadzonych badań. Z kolei, krytyczna analiza wyników identyfikacji białek PolyP oraz zaproponowane przez Doktorantkę sposoby dalszej optymalizacji opracowanej procedury pull-down wskazują na jej dojrzałość naukową. Za dojrzałością naukową przemawia także przedstawienie planu dalszych badań, które byłyby komplementarne do tych wykonanych w pracy i pozwoliły zweryfikować funkcjonowanie zaproponowanego mechanizmu regulacji aktywności DnaA przy udziale acetylacji, PolyP i CobB *in vivo*.

Biorąc powyższe pod uwagę, uważam, że rozprawa doktorska wskazuje, że Doktorantka osiągnęła samodzielność w prowadzeniu pracy naukowej w stopniu adekwatnym do etapu Jej rozwoju naukowego.

3. Czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego?

Celem pracy doktorskiej było opracowanie nowych metod izolacji i identyfikacji białek bakteryjnych związanych z granulami PolyP, a także wyjaśnienie roli polyP w kontekście zahamowania replikacji chromosomu bakteryjnego w warunkach stresu oraz w procesie wychodzenia ze stresu. Warto wspomnieć, że do tej pory opublikowano jedynie kilka analiz proteomicznych granuli PolyP oraz badań na temat znaczenia oddziaływań PolyP-białko. Doktorantka zaplanowała badania i przeprowadziła eksperymenty w sposób logiczny i metodyczny, co pozwoliło na osiągnięcie założonego celu naukowego. W szczególności:

- Doktorantka przeprowadziła izolację i identyfikację białek *E. coli* wykazujących zdolność wiązania PolyP z wykorzystaniem dwóch metod pull-down. W pierwszej metodzie zastosowała jako przynętę do izolacji białek biotynylowany PolyP skoniugowany ze streptawidyną osadzoną na złożu magnetycznym. Metoda ta została zastosowana jako wstępne badanie przesiewowe, które miało ujawnić potencjał białek *E. coli* do oddziaływania z PolyP niezależnie od tego, czy oddziałują one z PolyP *in vivo*. W drugiej metodzie przynętę stanowiła domena egzopolifosfatazy odpowiedzialna za wiązanie PolyP (PPBD) i umożliwiła ona identyfikację białek, które oddziałują z granulami PolyP w komórkach *E. coli*. Warto zauważyć, że drugie podejście badawcze jest pierwszym tego typu badaniem zastosowanym do identyfikacji białek PolyP, a wykonanie obu typów eksperymentów pull-down wymagało od Doktorantki wykonania licznych prac eksperymentalnych w celu przygotowania układów badawczych oraz opracowania warunków prowadzenia eksperymentów. Zastosowane metody pozwoliły Doktorantce zidentyfikować 21 białek jako potencjalnych interaktorów związanych z granulami PolyP w *E. coli*. Spośród zidentyfikowanych białek deacetylaza CobB została wybrana jako obiekt dalszych badań.

- Doktorantka wykazała, że w komórkach *E. coli* występują dwie izoformy deacetylazy CobB – długa (CobB-L) i krótka (CobB-S), a następnie pozytywnie zweryfikowała zdolność oddziaływania CobB-L z PolyP *in vitro* z zastosowaniem trzech niezależnych metod tj. zmiany tempa migracji w żelu (GMSA), powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) i interferometrii biowarstwowej (BLI). Wykazała ponadto, że CobB-L wykazuje również zdolność wiązania dwuniciowego DNA, ale wyznaczone wartości K_D wskazują na znacznie większe powinowactwo CobB-L do PolyP.

- Doktorantka wykazała, że PolyP nie wpływa na degradację żadnej z izoform CobB przez proteazy *E. coli in vitro*, a określona przez Nią zawartość CobB w komórkach *E. coli* wskazuje na dużą stabilność obu izoform tego białka również *in vivo* w warunkach głodu aminokwasowego.

- Doktorantka następnie wykonała szereg analiz mających na celu określenie wpływu PolyP na aktywność deacetylacyjną CobB w stosunku do DnaA. Zważywszy na fakt, że acetylacja lizyn prowadzi do inaktywacji białka DnaA, modulacja aktywności CobB przez polyP może być istotna w kontekście zahamowania replikacji chromosomu bakteryjnego w warunkach stresu oraz w procesie wychodzenia ze stresu. Doktorantka wykazała, że PolyP hamuje deacetylację DnaA przez obie izoformy CobB *in vitro*, co wynika z wiązania się PolyP zarówno do CobB-L jak i DnaA. Dodatkowo, hamują wpływ PolyP na aktywność deacetylacyjną CobB-L Doktorantka potwierdziła przeprowadzając analizę deacetylacji białka DnaK przez obie izoformy CobB.

- Doktorantka zaobserwowała, że acetylacja DnaA nie wpływa na wiązanie tego białka z PolyP *in vitro*. Dalsze badania Doktorantki wykazały, że zawartość DnaA w mutancie *E. coli* $\Delta cobB$ utrzymuje się na stałym poziomie w czasie wzrostu w warunkach głodu aminokwasowego. Obserwacja ta w połączeniu z zaobserwowanym wydłużonym czasem wyjścia hodowli mutantu $\Delta cobB$ z zastoju sugeruje, że acetylowane DnaA stanowi istotny rezerwuuar tego białka dla wznowienia replikacji DNA chromosomowego w procesie wychodzenia *E. coli* ze stresu.

W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka zaproponowała nowy mechanizm PolyP-zależnej regulacji aktywności DnaA w warunkach stresowych, w którym aktywność DnaA ulega zahamowaniu

na skutek acetylacji. Nieaktywny stan acetylowany DnaA w warunkach stresowych jest zapewniany przez wiązanie DnaA z PolyP, który hamuje deacetylację DnaA przy udziale CobB. Acetylowane DnaA służy jako rezerwuuar cząsteczek DnaA, które mogą ulec aktywacji przez deacetylację zachodzącą przy udziale CobB, gdy warunki środowiskowe ulegną poprawie i dojdzie do degradacji PolyP. Deacetylacja DnaA umożliwia więc przywrócenie jego aktywności po ustąpieniu stresu i ponowne zainicjowanie replikacji DNA chromosomowego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę dodają nowy wątek dotyczący plejotropowego efektu działania PolyP na replikację DNA komórek bakteryjnych i kontrolę aktywności CobB.

W mojej opinii rozprawa zawiera wyniki stanowiące oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunek stawiany w Ustawie.

Podczas czytania pracy nasunęły mi się następujące spostrzeżenia czy uwagi i poprosiłabym Doktorantkę o ich przedyskutowanie podczas obrony.

1. Białko CobB zostało zidentyfikowane jako potencjalny interaktor związany z granulami PolyP, nie zostało natomiast zidentyfikowane wśród białek zdolnych do wiązania PolyP wyizolowanych z wykładniczej fazy wzrostu *E. coli*. Jak wykazała analiza western blot, białko to jest produkowane w wykładniczej fazy wzrostu. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić możliwe przyczyny braku identyfikacji CobB w eksperymentach pull-down z wykorzystaniem biotynylowanego PolyP jako przynęty?

2. W eksperymentach pull-down z wykorzystaniem PPBD do izolacji białek PolyPomu zaobserwowano wysoki poziom niespecyficznego wiązania białek, co zostało w sposób adekwatny poddane krytycznej ocenie przez Doktorantkę. Zważywszy jednak na błędny opis wyników tych eksperymentów (opis Fig. 24A i 24B; omyłkowo podano opis stosowny dla metody pull-down z biotynylowanym PolyP jako przynętą), a także dość pobieżny opis analizy wyników poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie kilku kwestii. (I) Analiza SDS-PAGE prób kontrolnych (PPBD i SUMO bez dodatku lizatu) przedstawiony na Fig. 24B wskazuje na obecność licznych białek poza PPBD i SUMO. W jaki sposób można wyjaśnić obecność tych dodatkowych białek, zważywszy na fakt, że jakość i czystość PPBD oraz SUMO użytych w eksperymentach była bardzo dobra (Fig. 18D)? (II) Czy Doktorantka może przedstawić schemat analizy wykonanej dla wyników spektrometrii mass białek wyizolowanych z pull-down z zastosowaniem PPBD i SUMO dla obu typów lizatów? W tym kontekście interesujące jest czy porównano jedynie wyniki spektrometrii mass uzyskane dla PPBD po wiązaniu białek obecnych w lizatach szczepu dzikiego i mutanta Δppk , czy też wyniki uzyskane dla PPBD i SUMO z wykorzystaniem lizatu szczepu dzikiego? To drugie porównanie wydaje się być szczególnie cenne z uwagi na fakt, że delecja *ppk* powoduje globalne zmiany ekspresji genów i proteomu, czego dobrym przykładem jest obniżony poziom zawartości CobB w komórkach mutanta Δppk (Fig. 34). (III) Według jakich kryteriów uszeregowane zostały białka w Tabeli 10 i 11?

3. W pracy nie znalazłam opisu metody barwienia membran PonceauS. Czy barwienie to zostało wykonane dla analiz zawartości białek DnaA, CobB-L i CobB-S wyizolowanych z *E. coli* i wykorzystane do normalizacji wyników analiz densytometrycznych (wyniki prezentowane na Fig. 34 i 45)? Czy wyniki analiz densytometrycznych prezentowanych w pracy poddano analizie statystycznej?

4. Doktorantka zaobserwowała globalny wzrost acetylacji białek w komórkach *E. coli* hodowanych w podłożu MOPS. W tych warunkach zawartość DnaA w mutancie *E. coli* $\Delta cobB$ utrzymuje się na stałym poziomie, co sugeruje, że acetylacja DnaA może zwiększać stabilność tego białka. Czy acetylacji mogą podlegać inne białka istotne z punktu widzenia regulacji stabilności DnaA, np. proteaza Lon?

5. Według opisu metody hodowli i izolacji białko DnaA zostało wyizolowane ze stacjonarnej fazy wzrostu. Białko to w analizie oddziaływania PolyP z różnymi wariantami DnaA (wyniki prezentowane na

Fig. 37) oraz analizie wpływu PolyP na proteolizę różnych wariantów DnaA przez proteazę Lon (wyniki prezentowane na Fig. 44) zostało opisane jako wariant zawierający zarówno DnaA-ATP i DnaA-ADP i służyło jako próba odniesienia dla wariantu DnaA poddanego acetylacji. Biorąc pod uwagę, że acetylacja jest opisywana w literaturze jako modyfikacja białek charakterystyczna dla stacjonarnej fazy wzrostu hodowli (Zhang et al. doi:10.1038/srep30837, Kim et al. doi: 10.1002/pmic.201200001) czy Doktorantka sprawdziła jaki jest stopień acetylacji oczyszczonego białka DnaA użytego we wspomnianych analizach?

6. Czy wiadomo, które aminokwasy DnaA odpowiadają za oddziaływanie z PolyP? Czy acetylacja i wiązanie PolyP w DnaA może dotyczyć tych samych aminokwasów?

Praca została napisana bardzo schudnie, niemniej jednak są w niej drobne błędy. Z obowiązku recenzenta, ale też z punktu widzenia zainteresowanego pracą czytelnika, zwracam więc uwagę na kilka niedociągnięć redakcyjnych utrudniających odbiór i interpretację wyników:

1. W przypadku analiz SPR i BLI Doktorantka podała stężenie molarne badanych białek, natomiast w analizach GMSA podano ilość białka w pmolach. Dla ułatwienia porównania wyników wspomnianych analizy korzystne byłoby zastosowanie jednakowych jednostek.
2. Na figurach prezentujących wyniki analiz GMSA brakuje informacji o zastosowanych zakresach stężeń białek i PolyP oraz ilości DNA. Stężenia w obrębie stosowanych zakresów powinny zostać precyzyjnie opisane.
3. Błędny odnośnik do numeru tabeli na str. 41 (powinno być Tabela 9)
4. Błąd w tytule opisu Figury 34 – wyniki przedstawiają zawartość białka CobB w komórkach, a nie stabilność białka CobB.
5. Brak oznaczenia szczepów, dla których zaprezentowano wyniki na Figurze 43.
6. Inny dobór kolorów na Figurze 43A poprawiłby jej czytelność.

Podsumowując recenzję rozprawy doktorskiej Pani Magdaleny Sroki stwierdzam, że Doktorantka wykonała badania naukowe osiągając założony cel pracy doktorskiej. Moje uwagi nie umniejszają wartości pracy, ani osiągnięć Doktorantki. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sroki spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani Magdaleny Sroki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.