

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAN
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
agata.starosta@ibb.waw.pl
tel. 22 592 3341

Warszawa, 10.11.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Eweliny Boguszewskiej

Rozprawa doktorska zatytułowana „Analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* w trakcie głodu aminokwasowego” została przygotowana przez Panią Ewelinę Boguszewską pod opieką promotorską prof. dr hab. Igora Koniecznego. Praca została przedłożona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest analiza roli białek DnaA i plazmidowego TrfA w procesie regulacji inicjacji replikacji chromosomalnego lub plazmidowego DNA (zahamowania replikacji) w warunkach stresu wywołanych niedoborem aminokwasu seryny w porównaniu do warunków optymalnego wzrostu. Wyniki przedstawione w pracy są nowe, częściowo już opublikowane i stanowią uzupełnienie badań dotychczas publikowanych przez grupę profesora Koniecznego.

Praca doktorska mgr Eweliny Boguszewskiej została napisana w języku polskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest właściwy i prawidłowy dla danego formatu. Praca jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Streszczenie, Wstęp, Cel Pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja*. Autorka wykorzystała obszerną bibliografię odwołującą się do 256 artykułów naukowych. Autorka stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. W pracy brakuje listy rycin i tabel. Praca jest przejrzysta, rzeczowa oraz starannie przygotowana. Tekst opatrzonej jest 39 rycinami i 13 tabelami. Większość rycin jest starannie przygotowane, opisy na nich umieszczone są czytelne. Bibliografia została odpowiednio użyta w tekście i we właściwy sposób użyta do dyskusji wyników.

Pierwszy rozdział, *Wstęp*, autorka rozpoczyna zwięzłym opisem organizmu modelowego, bakterii *Escherichia coli*, w badaniach odpowiedzi na stres. Autorka przybliży rolę alarmonu (p)ppGpp oraz akumulacji polimeru – polifosforanu (polyP) w adaptacji bakterii do zmiennych warunków. W drugiej części *wstępu* autorka przybliży informacje dotyczące inicjacji replikacji chromosomalnego DNA, opisuje rolę białka DnaA, proces inicjacji replikacji i kontroli replikacji w warunkach optymalnych, w tym rolę metylacji regionu *oriC*, rolę białek NAP (w tym Fis i IHF). W kolejnej części *Wstępu*, autorka przybliży proces inicjacji i kontroli inicjacji replikacji plazmidu RK2 w *E. coli*, w tym rolę białka TrfA. Autorka kończy *Wstęp* opisem wpływu stresu na proces inicjacji replikacji DNA.

Następnie, autorka przedstawia szczegółowy *Cel badawczy*, którego zadaniem jest analiza białek inicjatorowych replikacji DnaA i TrfA u bakterii *Escherichia coli* w warunkach niedoboru aminokwasu seryny w tym (I) lokalizację DnaA, (II) poziom białka DnaA w badanych warunkach, (III) identyfikacja miejsc wiązania DnaA do chromosomalnego DNA oraz (IV) oddziaływania DnaA i TrfA z plazmidowym *oriV*.

W rozdziale *Materiały*, autorka podaje listy szczepów bakterii *E. coli*, plazmidów, oligonukleotydów, białek, odczynników, przeciwciał, pożywek do hodowli mikroorganizmów, antybiotyków wykorzystanych w badaniach.

W rozdziale *Metody*, autorka opisuje protokoły, z których korzystał w celu realizacji zadań badawczych. Opisane są między innymi procedury obrazowania bakterii, przygotowania DNA i białek do analiz, procedury EMSA, ChIP-seq, Western Blot, sekwencjonowania NGS, analiza zebranych danych.

Sekcję *Wyniki* autorka rozpoczyna opisem przygotowania aktywnego, fluorescencyjnie wyznakowanego białka DnaA do analiz *in vitro* i *in vivo*. Autorka prowadzi obrazowanie pojedynczych komórek techniką ujęć poklatkowych w celu zebrania informacji o lokalizacji białka DnaA w komórkach *E. coli* w warunkach optymalnego wzrostu, w czasie stresu wywołanego niedoborem aminokwasu seryny oraz w czasie wyjścia ze stresu. Przeanalizowane dane zostały zaprezentowane jako kymografy. Dla komórek rosnących w warunkach optymalnych, autorka przedstawia schemat lokalizacji DnaA (Rycina 16), brakuje podobnego schematu dla warunków stresowych i wyjścia ze stresu. Na podstawie danych, autorka przedstawia również charakterystykę bakterii na różnych etapach hodowli, ich długość, średnicę, objętość i zauważa, że w czasie stresu wywołanego głodem aminokwasowym komórki skracają się i charakteryzują się mniejszą objętością cytoplazmy. W kolejnym kroku autorka testuje jak zmienia się poziom DnaA w komórkach *E. coli* w czasie wzrostu w warunkach optymalnych, stresu i okresu wyjścia ze stresu. Autorka obserwuje spadek poziomu DnaA w czasie stresu oraz zwiększony poziom w okresie wyjścia ze stresu.

Następnie autorka analizuje już sam proces replikacji chromosomalnego DNA wykorzystując analizy qPCR do monitorowania regionu *oriC* i cytometrię przepływową w celu ustalenia ilości DNA w komórkach w układzie eksperymentalnym. W czasie stresu, gdy komórki nie dzielą się, autorka obserwuje synchronizację liczby chromosomów w komórkach wynikającą z zatrzymania replikacji. W aktywnie dzielących się komórkach, trudnych do zsynchronizowania, zgodnie z oczekiwaniem obserwuje zmienną ilość DNA. W kolejnym kroku, autorka badała wiązanie DnaA do chromosomalnego DNA metodą immunoprecypitacji połączonej z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem DNA ChIP-Seq. Autorka obserwuje wyższe pokrycie genomu próbek wyjściowych DNA w okolicy *oriC* dla komórek rosnących w warunkach optymalnych i wychodzących ze stresu – czyli aktywnych replikacyjnie, oraz stosunkowo jednorodne pokrycie genomu dla komórek w stresie. Co jest zbieżne z wynikami poprzednich analiz oraz wskazuje na warunki hodowli pozwalające na przeprowadzenie analiz. Analizy frakcji DNA wzbogaconych przy immunoprecypitacji DnaA pokazują wiązanie DnaA do *oriC* oraz kilkunastu regionów chromosomalnego DNA w warunkach wzrostu optymalnego i po wyjściu ze stresu. Natomiast w czasie stresu, nie wykazano wiązania DnaA do *oriC*. Zaobserwowano mniejszą częstotliwość wiązania DnaA do chromosomalnego DNA. Optymalna sekwencja, do którą rozpoznaje białko DnaA jest znana, autorka przeszukała genom *E. coli* w celu identyfikacji idealnych DnaA-box oraz sekwencji z różniących się jednym lub dwoma nukleotydami od sekwencji idealnej oraz przyrównała otrzymane wyniki ChIP-seq z tą informacją. Autorka wykazała, że ze wszystkich zidentyfikowanych regionów (ze wszystkich

eksperymentów), DnaA wiąże się do Dna-box lub sekwencji bardzo podobnych. Następnie autorka pokazuje *in vitro*, że DnaA wiąże się do *oriC* oraz do wybranej sekwencji DNA zidentyfikowanej w ChIP-seq oraz potwierdza brak wiązania do regionu *terC*, co było również obserwowane w immunoprecypitacji DNA z DnaA.

Autorka testuje czy wpływ poziomu białka DnaA w komórce wpływa na częstotliwość wiązania do *oriC* chromosomalnego DNA. Autorka zademonstrowała, że w szczepie dzikim, w czasie stresu poziom białka DnaA wyraźnie spada w porównaniu do warunków optymalnego wzrostu. W mutancie *E. coli* pozbawionym kinazy polifosforanowej (PPK) odpowiedzialnej za syntezę polyP, poziom DnaA nie spada. Autorka testuje wiązanie DnaA do *oriC* i *terC* w szczepie delta-*ppk*. Pokazuje, że mimo braku spadku poziomu białka DnaA w mutancie w czasie warunków stresu nie następuje duże zwiększenie wiązania DnaA do *oriC* co sugeruje inny mechanizm ograniczania wiązania białka do *oriC* niż jedynie spadek poziomu białka.

W ostatniej części *Wyników*, autorka testuje wiązanie białka DnaA w warunkach wzrostu w optymalnych warunkach, w stresie oraz podczas wyjścia ze stresu do *oriV* plazmidowego DNA. W szczepie dzikim *E. coli*, w mutancie delta-*ppk* oraz delta-*fis* (genu kodującego białko Fis biorące udział w inicjacji replikacji) i zaobserwowano podobne trendy dla chromosomalnego i plazmidowego DNA. Brak białka Fis nie wpływa znacząco na wiązanie DnaA do *oriC* i *oriV*. Autorka testuje również wpływ acetylacji na zdolność DnaA do wiązania do DNA i używając przeciwciał wykrywających acetylację pokazuje, że w czasie stresu jest więcej cząsteczek DnaA ulegających acetylacji niż w warunkach optymalnych co może wpływać na zdolność do wiązania do DNA. Następnie autorka bada wiązanie plazmidowego inicjatora replikacji – białka TrfA do *oriV*. TrfA, podobnie jak DnaA, wiąże się do *oriV* w czasie wzrostu w warunkach optymalnych oraz przy wyjściu ze stresu, natomiast w warunkach stresu nie wiąże się do origin plazmidu. Natomiast TrfA nie wiąże się do chromosomalnego DNA. Autorka pokazuje, że białko TrfA ulega degradacji w czasie stresu. Co może być jednym z mechanizmów inhibicji replikacji plazmidu w warunkach stresu głodu aminokwasowego.

W *Dyskusji* autorka rozważa rolę białek DnaA i TrfA w inicjacji replikacji chromosomalnego i plazmidowego DNA w warunkach wzrostu w warunkach optymalnych oraz w czasie stresu. Autorka podejmuje próbę wyjaśnienia wyników w kontekście danych literaturowych.

Podsumowując, autorce pracy udało się pokazać lokalizację i profile wiązania białka DnaA do chromosomalnego DNA w warunkach wzrostu w warunkach optymalnych i w stresie, autorka pokazuje, że DnaA nie wiąże się do *oriC* w czasie stresu oraz proponuje, że acetylacja DnaA może wpływać na sposób wiązania się białka do DNA w tych warunkach, co w konsekwencji ma wpływ na zahamowanie inicjacji replikacji w warunkach nieoptymalnych. Autorka charakteryzuje również inicjację replikacji plazmidowego DNA. Doktorantka pokazuje, że plazmidowe białko TrfA współdziała z DnaA i tak jak DnaA nie wiąże się do *oriV* w czasie stresu.

Uwagi:

- Brakuje przepisu na pożywkę minimalną, MOPS z eksperymentu z Ryciny 25.
- Na Rycinie 15 brakuje opisów osi, rycina jest niejasna.
- Na Rycinie 16 pomocne by były schematy lokalizacji białka DnaA jak na rycinie 15

- Uwaga dotycząca wyników zaprezentowanych na Rycinie 20, OD nie jest najlepszą metodą do ustalania liczby komórek gdy ich rozmiar się zmienia. Zmieni się również rozpraszanie światła. W takich warunkach warto przetestować relację OD z CFU (colony forming units).
- Pytanie dotyczące wyników na zaprezentowanych na Rycinie 22, czy w tym eksperymencie komórki, które się dzielą, już powstała septa, ale jeszcze się nie rozdzieliły są widoczne?
- W miejscach wiązania DnaA do nieoptymalnych DnaA-box, czy dominowała substytucja konkretnym nukleotydem?

Prośba o przedyskutowanie:

- Jakich wyników by się Pani spodziewała w mutancie *delta-relA*? Jak alarmon wpływa na dostępność *oriC* dla DnaA?
- Jaki wpływ na wiązanie DnaA do DNA ma metylacja DNA? Czy miejsca DnaA-box poza *oriC* też ulegają metylacji?
- Czy kondensyny mogą wpływać na obserwowane wyniki?
- Czy próbowała Pani porównywać wyniki ze znanymi strukturami 3D chromosomu *Escherichia coli*?

Niniejszą pracę oceniam *pozytywnie*. Autorka prawidłowo planuje eksperymenty i wyciąga wnioski. Autorka stosuje wiele metod i z powodzeniem próbuje integrować wyniki pozyskane nimi. Wyniki stanowią kontynuację zagadnień badanych w laboratorium promotora. Część wyników jest już opublikowana w recenzowanym czasopiśmie.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Eweliny Boguszeńskiej spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.).

Zwracam się do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Boguszeńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Dr hab. Agata Starosta

