



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Genetyki Bakterii  
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 18.02.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Gross, pt.**

***"Analiza stabilności białka DnaA Escherichia coli w regulacji inicjacji replikacji DNA"***

***(The analysis of the stability of Escherichia coli DnaA protein in the regulation of DNA replication)***

Przedstawiona mi do recenzji praca została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem prof. dr. hab. Igora Koniecznego oraz dr Katarzyny Węgrzyn, promotora pomocniczego.

Tematyka rozprawy dotyczy replikacji DNA, a więc jednego z podstawowych procesów zachodzących w komórkach wszystkich organizmów. Poznanie mechanizmu powielania informacji genetycznej było jednym z kamieni milowych w dziejach nauki i zapoczątkowało dynamiczny rozwój biologii molekularnej. Większość badań nad replikacją DNA przeprowadzono na modelach bakteryjnych, jednak uzyskane wyniki mają wymiar uniwersalny, bowiem proces ten przebiega według podobnego scenariusza również w komórkach eukariotów i archeonów.

Klasyczny model replikonu zaproponowano już w latach 60. ubiegłego wieku. Zakładał on istnienie dwóch kluczowych komponentów systemów replikacyjnych, tj. *origin*, w którym dochodzi do zapoczątkowania syntezy DNA, oraz elementu inicjatorowego, który inicjuje replikację w miejscu *origin*. Przedstawione wówczas przewidywania okazały się w pełni trafne. Pozwoliły one nie tylko na zdefiniowanie systemów replikacyjnych, lecz również wskazały inicjację, jako główny etap decyzyjny, odgrywający kluczową rolę w regulacji replikacji.

Regulacja inicjacji replikacji jest zagadnieniem bardzo złożonym. Zapewnienie odpowiedniej liczby kopii replikonu w komórce, powiązanie replikacji z określonym etapem cyklu komórkowego oraz skorelowanie częstości jej inicjacji z tempem metabolizmu komórki (na co mają również wpływ warunki środowiska zewnętrznego), wymaga współdziałania globalnych mechanizmów regulacyjnych. Wypadkową aktywności tych mechanizmów jest decyzja o zainicjowaniu lub zahamowaniu kolejnej rundy replikacji, co determinuje również częstość podziałów komórkowych, a tym samym tempo wzrostu komórek bakterii, dostosowane do danych warunków środowiskowych.

Tematyka badawcza ocenianej rozprawy wpisuje się w ten nurt tematyczny. Doktorantka podjęła się trudnego, lecz nośnego od strony naukowej zadania, jakim było, ogólnie ujmując, poszukiwanie nowych mechanizmów zaangażowanych w regulację inicjacji replikacji DNA w komórkach bakterii *Escherichia coli*. Doktorantka zadała sobie pytanie, czy zahamowanie replikacji w warunkach stresowych może być spowodowane degradacją białka DnaA, odpowiadającego za inicjację replikacji chromosomu bakteryjnego. Po przeprowadzeniu ciągu precyzyjnie zaplanowanych eksperymentów, uzyskała odpowiedź na to pytanie, osiągając tym samym założony cel naukowy rozprawy. Biorąc pod uwagę istotność analizowanego zagadnienia, nie ulega dla mnie wątpliwości, że wybór, zarówno tematyki badań, jak i problemu badawczego, były trafne i w pełni uzasadnione.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Gross została przygotowana w języku angielskim, w formie spójnego tematycznie opracowania, z zachowaniem odpowiednich proporcji między jej poszczególnymi częściami. Liczy ona 101 stron i została podzielona na rozdziały, o układzie typowym dla prac doświadczalnych, obejmującym: streszczenie (również w języku polskim), wstęp, cel badań, materiały, metody, wyniki, dyskusję i literaturę. W rozprawie zamieszczono ponadto wykaz stosowanych skrótów, a całość opatrzone 30 rycinami i 2 tabelami. Uwagę zwraca duża dbałość o walory edytorskie rozprawy, a także to, że została ona napisana zwięźle, bardzo dobrym językiem, z dużą precyzją w formułowaniu myśli i wniosków.

**Wstęp**, przygotowany w oparciu o bogaty zestaw pozycji literaturowych, zarówno starszych, jak i opublikowanych w ostatnich latach, znakomicie wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy. W rozdziale tym można wyróżnić dwie główne części. Pierwsza charakteryzuje komponenty systemu replikacyjnego chromosomu *E. coli*, czyli białko DnaA i region *origin (oriC)*, a następnie przedstawia molekularne podstawy przebiegu kolejnych etapów inicjacji replikacji. Druga część koncentruje się na opisie poznanych dotąd mechanizmów kontrolujących proces inicjacji replikacji, działających poprzez: (i) regulację poziomu transkrypcji genu *dnaA* (autoregulacyjna funkcja DnaA), (ii) regulację aktywności powstałego białka inicjatorowego oraz (iii) sekwestrację *origin* z udziałem białka SeqA. Szczególną uwagę Doktorantka poświęca roli nukleotydów adeninowych w modulowaniu aktywności białka DnaA. Wstęp kończy krótki rozdział opisujący wpływ warunków stresowych na replikację DNA w komórkach bakterii, z zamieszczoną klarowną ryciną ilustrującą podstawy odpowiedzi ścisłej. Tematyka Wstępu prowadzi czytelnika bezpośrednio do odpowiednio postawionego **Celu naukowego**, jakim było poznanie mechanizmów kontrolujących inicjację replikacji DNA w komórkach *E. coli*, w warunkach stresowych.

Przy opisie właściwości autoregulacyjnych białka inicjatorowego zaznaczono, że gen *dnaA* znajduje się w jednym operonie z genem *dnaN* oraz genem *recF*, uczestniczącym w odpowiedzi SOS. Układ tych genów jest zachowany ewolucyjnie również w innych klasach taksonomicznych bakterii, co sugeruje jego istotność. Poprosiłbym o podanie bardziej szczegółowych informacji o tym operonie i regulacji jego ekspresji.

W kolejnych dwóch rozdziałach rozprawy opisano wykorzystane **materiały** oraz **metodykę** prac eksperymentalnych. W badaniach wykorzystano wyłącznie plazmidy i szczepy bakteryjne zdefiniowane pod względem genetycznym. Z obowiązku recenzenta wspomnę jedynie, że według powszechnie przyjętych reguł, oporność na antybiotyki determinowana przez geny plazmidowe powinna być oznaczana kodem dwuliterowym (np. Ap<sup>r</sup> – oporność na ampicylinę), natomiast analogiczny fenotyp uwarunkowany genami chromosomowymi określa się kodem trzyliterowym (np. Amp<sup>r</sup>). Doktorantka nie stosuje tych reguł przy opisie fenotypów plazmidów (str. 35-36). Zwracam również uwagę na nieodpowiednią formę pisowni nazw enzymów restrykcyjnych (np. BamHI; np. str. 37 i 45) oraz wzorów chemicznych niektórych związków (np. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; str. 41).

Należy podkreślić, że Doktorantka wykorzystwała w badaniach bogaty zestaw metod z zakresu biochemii, genetyki i biologii molekularnej. Realizacja zaplanowanych zadań badawczych wymagała oczyszczanych kilkunastu w pełni aktywnych białek, a także konstrukcji (*in vitro* bądź *in vivo*) licznych złożonych układów badawczych. Dowodzi to bardzo dobrego warsztatu molekularnego Doktorantki oraz umiejętności doboru metod i narzędzi, odpowiednich do realizacji poszczególnych zadań badawczych rozprawy.

**Wyniki** przedstawiono na 17 stronach rozprawy. Kolejne opisane wątki badawcze stanowią logiczny ciąg przyczynowo-skutkowy, co powoduje, że rozdział ten czyta się z dużym zainteresowaniem, z łatwością śledząc tok rozumowania Doktorantki.

Prace rozpoczęto od weryfikacji głównej hipotezy, zakładającej, że w komórkach *E. coli* podczas odpowiedzi ściślej dochodzi do degradacji białka DnaA. Badania te przeprowadzono m.in. po indukcji warunków głodu aminokwasowego inhibitorem syntetazy serylo-tRNA oraz w warunkach fazy stacjonarnej wzrostu bakterii. Zgodnie z oczekiwaniami, w warunkach stresowych zaobserwowano zmniejszenie ilości DnaA, jednak nie dochodziło do jego całkowitej degradacji. Doktorantka scharakteryzowała zachowaną w komórce frakcję DnaA. Wykorzystując technikę immunoprecypitacji kompleksów nukleoproteinowych (NCIP) wykazała, że protekcji ulegają cząsteczki białka, które w warunkach stresowych związane są z DNA – zarówno te, które efektywnie wiążą się wówczas z promotorem p2 genu *dnaA*, jak i cząsteczki związane z *oriC*.

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy białko DnaA wchodzi w interakcje z nieorganicznym polifosforanem (PolyP), który powstaje w warunkach stresowych i moduluje właściwości proteolityczne proteazy Lon. Wymagało to wykorzystania oczyszczonego białka DnaA, którego aktywność zweryfikowano, potwierdzając jego zdolność wprowadzania helikazy do kompleksu inicjacyjnego. Efektem przeprowadzonych *in vitro* analiz było zademonstrowanie specyficznych interakcji DnaA z PolyP oraz wykazanie, że za oddziaływanie to odpowiada domena DnaA determinująca również wiązanie białka z DNA.

Dalsze badania przyniosły wyniki potwierdzające, że białko DnaA jest degradowane przez proteazę Lon w warunkach stresowych. W teście ELISA pokazano bezpośrednie interakcje obu białek, a w układach *in vivo* zademonstrowano, że zarówno w szczepie *E. coli* defektywnym w produkcji proteazy, jak i w szczepie dzikim, w którym nadprodukowano białko DnaA, replikacja DNA, mimo zaindukowania odpowiedzi ściślej, jest kontynuowana.

W końcowym etapie badań analizowano wpływ nukleotydów adeninowych, ATP i ADP, na proteolizę białka DnaA. Wyniki przeprowadzonych *in vivo* analiz wskazywały na to, że akumulacja w komórce formy DnaA-ADP koreluje ze zwiększoną aktywnością proteolityczną, a forma DnaA-ATP nie ulega proteolizie. Zasadne było zweryfikowanie tych obserwacji w układzie *in vitro*, co nie było łatwym zadaniem. Doktorantka doskonale poradziła sobie jednak z tym wyzwaniem, m.in. dzięki odtworzeniu *in vitro* naturalnego systemu regulacyjnego RIDA, który poprzez oddziaływanie z DnaA-ATP i stymulację hydrolizy ATP, umożliwił uzyskanie czystej formy DnaA-ADP, wykorzystanej we właściwym badaniu.

Dzięki logicznie zaprojektowanym eksperymentom, licznym skonstruowanym układom badawczym – *in vivo* i *in vitro* – oraz zastosowaniu odpowiednich kontroli, Doktorantka uzyskała wiarygodne i jednoznaczne wyniki świadczące o istnieniu nieopisanego wcześniej mechanizmu inicjacji replikacji, który nazwała akronimem SIDDA (ang. *Stress Induced Degradation of DnaA*). Podstawą tego mechanizmu są trzy najważniejsze obserwacje ocenianej rozprawy, świadczące o tym, że: (i) proteaza Lon degradowuje DnaA w obecności PolyP, co skutkuje zahamowaniem inicjacji replikacji DNA w czasie odpowiedzi ścisłej, (ii) proteaza Lon w kompleksie z PolyP wybiórczo degradowuje DnaA-ADP oraz (iii) że w warunkach stresowych białko DnaA wiąże się efektywnie z promotorem kodującego je genu, co blokuje jego ekspresję. Praca ta przyniosła również wiele pomniejszych, lecz ważnych obserwacji, do których Doktorantka nawiązuje w Dyskusji rozprawy.

Przytoczone w końcowej części Wyników wstępne dane na temat białka inicjatorowego TrfA plazmidu RK2 sugerują, że mechanizm SIDDA może potencjalnie regulować inicjację replikacji również niektórych replikonów pozachromosomowych, co otwiera nowe perspektywy badawcze. Pomijając ten niezbadany jeszcze wątek plazmidowych białek inicjatorowych, a mając na uwadze jedynie udział białka DnaA w inicjacji replikacji wielu plazmidów, chętnie usłyszę zdanie Doktorantki, czy, i w jaki sposób, mechanizm SIDDA może rzutować na powielanie tych replikonów.

**Dyskusja** rozprawy jest ciekawa i rzeczowa. Przedstawia ona różne aspekty modelu SIDDA oraz odnosi się do najważniejszych obserwacji i wątków rozprawy. Została ona poprowadzona na tle istotnych i prawidłowo dobranych publikacji naukowych. W końcowej części tego rozdziału Doktorantka przedstawia również szerszą perspektywę praktycznego wykorzystania uzyskanych przez nią wyników. Spis pozycji bibliograficznych zamieszczonych w rozdziale **Literatura** jest bardzo obszerny. Moja krytyczna uwaga dotyczy braku numerów stron i numerów woluminów w przypadku zdecydowanej większości podanych pozycji, co odbiega od przyjętych standardów.

Podsumowując, Doktorantka osiągnęła podstawiony w rozprawie cel naukowy – określiła przyczynę zahamowania replikacji DNA w komórkach *E. coli* w warunkach stresowych, co pozwoliło jej na zaproponowanie autorskiego modelu, ilustrującego mechanizm tej inhibicji. Należy zaznaczyć, że stawianie w pracach doktorskich tak istotnych dla nauki pytań nie zdarza się często i cechuje wyłącznie zespoły o ustalonej renomie naukowej, do jakich niewątpliwie zalicza się grupa kierowana przez prof. dr. hab. Igora Koniecznego.

Doktorantka do realizacji kolejnych zadań badawczych wykorzystwała oryginalne rozwiązania metodyczne. Wykazała przy tym zdolność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, właściwej analizy uzyskanych danych oraz wyciągania uprawnionych wniosków. Nie ulega wątpliwości, że zaplanowanie tych badań i dyskusja ich wyników wymagało dogłębnej wiedzy teoretycznej Doktorantki, nie tylko na temat procesu replikacji DNA, lecz także z zakresu biochemii, genetyki i biologii komórki bakteryjnej.

W mojej ocenie rozprawa ta w pełni spełnia warunki stawiane pracom doktorskim. Wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Marty Gross do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Nie znajduję w bazach bibliograficznych informacji na temat publikacji wyników rozprawy. Jeśli jednak warunek ten został spełniony, mając na względzie wysoki poziom przeprowadzonych badań oraz wagę uzyskanych wyników, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik

