



26 WRZ 2013

wtorek, 24 września 2013

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium  
Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej „The genetic basis of the correlation between DNA replication regulation, central carbon metabolism and stress alarmons in *Escherichia coli* cells”.**

Tylko nieliczni Doktoranci stają przed szansą realizacji swojej pracy doktorskiej w uznanych na świecie zespołach badawczych od lat regularnie publikujących swoje prace w czołowych czasopismach naukowych. Do zespołów takich niewątpliwie należy zaliczyć macierzystą jednostkę Doktorantki, Katedrę Biologii Molekularnej kierowaną przez prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, w tym grupę badawczą promotora recenzowanej pracy, dr hab. Agnieszki Szalewskiej Pałasz, prof. UG. Ze względu na dostęp do bogatego, wyszukanego warsztatu badawczego, niezbędnej aparatury naukowej i co najważniejsze do wiedzy i doświadczenia naukowego promotora stawiane przed Doktorantką oczekiwania są z pewnością również bardzo wysokie. Bardzo miło mi, jako recenzentowi po lekturze pracy doktorskiej stwierdzić, że te wysokie oczekiwania zostały w pełni spełnione.

Pracę doktorską Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej stanowi zbiór spójnych tematycznie pięciu prac eksperymentalnych o sumarycznym współczynniku cytowalności  $IF > 10$ . We wszystkich pracach wchodzących w skład zbioru, Doktorantka jest pierwszą autorką, a dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do jej kluczowej roli w realizacji opisywanych badań. Trzy z tych prac opublikowane w *Microbial Cell Factories*, *Mutation Research* oraz *Gene* opisują zależność pomiędzy centralnym metabolizmem węgla a procesem replikacji DNA w komórkach *E. coli*. Kolejna praca opublikowana w *Plasmid* udowadnia hamowanie aktywności prymazy DnaG przez czterofosforan guanozyny (ppGpp),





natomiast ostatnia, opublikowana w *FEBS Open Bio* wskazuje na odmienny efekt alarmonu ppGpp na aktywność DnaG w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

W realizacji pierwszej z ww. prac Doktorantka skonstruowała kolekcję kilkudziesięciu rekombinowanych szczepów *E. coli* noszących punktowe mutacje w genach kodujących wybrane białka uczestniczące zarówno w procesie inicjacji jak i elongacji replikacji nadające im fenotyp temperaturo-wrażliwości oraz mutacje delecyjno/insercyjne w genach szlaków centralnego metabolizmu węgla (glikolizy, glukoneogenezy, szlaku pentozofosforanowego, cyklu Krebsa i szlaku metabolizmu pirogronianu). Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, czy obserwowane w komórkach *Bacillus subtilis* zjawisko znoszenia efektu fenotypowego związanego z obecnością mutacji w genach kodujących białka procesu replikacji poprzez inaktywację genów centralnego metabolizmu węgla jest unikalne dla tego gatunku czy również występuje w komórkach *E. coli*. Uzyskane przez Doktorantkę mutanty i przeprowadzone z ich udziałem analizy wzrostu jednoznacznie potwierdziły stawianą hipotezę o ścisłej zależności pomiędzy procesem replikacji DNA oraz metabolizmem węgla u *E. coli*. Poczynione obserwacje zostały potwierdzone dzięki zastosowaniu szczepów komplementowanych funkcjonalnymi genami metabolizmu węgla, a przeprowadzone kontrole wykluczyły możliwość efektu niespecyficznego w postaci spowolnienia wzrostu u podwójnych mutantów.

W kolejnej pracy Doktorantka kontynuowała rozwiązywanie postawionego problemu badawczego poprzez analizę efektu mutatorowego w szczepach *E. coli* noszących punktowe mutacje w genach podjednostek polimerazy III (*dnaQ* i *dnaX*) oraz mutacje delecyjne w genach centralnego metabolizmu węgla. Autorzy zaobserwowali, że efekt mutatorowy obserwowany poprzez analizę spontanicznych mutantów opornych na rifampicynę lub kwas nalidyksynowy, związany z mutacjami punktowymi w genach *dnaQ* oraz *dnaX* może zostać zmieniony poprzez delecję niektórych genów metabolizmu węgla. Poczynione obserwacje potwierdzono z zastosowaniem szczepów komplementacyjnych oraz podobnie jak w pierwszej pracy wykluczono możliwość efektu niespecyficznego w postaci spowolnienia wzrostu u podwójnych mutantów.

Kontynuując badania zależności pomiędzy procesem replikacji oraz metabolizmem węgla w komórce *E. coli* Doktorantka przeprowadziła analizę długości komórek mutantów *dnaA*, *dnaB*, *dnaE*, *dnaG* i *dnaN* oraz rozmieszczenia w nich nukleoidów przy funkcjonalnych oraz





defektywnych genach metabolizmu węgla. Przeprowadzone analizy jednoznacznie wykazały, że delekcja niektórych z badanych genów centralnego metabolizmu węgla znacząco zmniejsza efekty fenotypowe związane z mutacjami w genach kodujących białka procesu replikacji. Ponownie uzyskane obserwacje zostały potwierdzone poprzez konstrukcję szczepów komplementowanych.

Zależność pomiędzy procesem replikacji DNA oraz metabolizmem komórki była od dawna szeroko akceptowana, do niedawna rozumiano ją jednak jako efekt niespecyficzny, oparty o limitowany dostęp energii czy prekursorów dla makromolekuł, czy też wynikający z syntezy w odpowiedzi na limitowany dostęp źródeł węgla, specyficznych cząsteczek sygnałnych takich jak ppGpp czy cAMP. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, oraz nieliczne prace innych autorów na modelu *B. subtilis*, wskazują, że zależności pomiędzy badanymi procesami są zależnościami specyficznymi opartymi o obecność funkcjonalnych enzymów, często nie będących niezbędnymi dla procesów metabolicznych w których uczestniczą. Na podstawie uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań na modelu *E. coli* centralną rolę w tym procesie należałoby przypisać produktom genów *pta* i *ackA* z procesu metabolizmu pirogronianu. Mutacje tych genów znosiły fenotyp termo-wrażliwości mutantów *dnaA*, *dnaB*, *dnaG* i *dnaN*, zarówno na poziomie analizy liczby kolonii jak i zaburzeń w morfologii komórek oraz wpływały na fenotyp mutatorowy termo-wrażliwych mutantów *dnaQ* oraz *dnaX* (z przeciwnym efektem). **Czy wobec tego należy przypuszczać, że szlak metabolizmu pirogronianu ma szczególne znaczenie dla procesu replikacji DNA w komórkach *E. coli* czy też enzymy kodowane przez *pta* i *ackA* posiadają dodatkowe aktywności wskazujące na ich rolę w procesach związanych z metabolizmem DNA ? Czy z przeprowadzonych w zespole badań lub jeśli są dostępne analiz globalnej odpowiedzi transkrypcyjnej komórki wynikającej z delekcji genów *pta* i *ackA* (lub innych dających podobny efekt fenotypowy) możemy zaobserwować znaczące zmiany poziomu ekspresji enzymów zaangażowanych w syntezę specyficznych cząsteczek sygnałnych ? Czy przynajmniej częściowym wyjaśnieniem obserwowanych zmian fenotypu termo-wrażliwości badanych mutantów nie byłaby ewentualna nadprodukcja białek opiekuńczych wspomagających prawidłowe złożenie białek transkrypcyjnych noszących t mutacje nadające im termo-wrażliwość?**

Dwie kolejne prace dotyczą analizy roli czterofosforanu guanozyny jako potencjalnego inhibitora procesu elongacji replikacji. W pierwszej z tych prac Doktorantka w elegancki sposób





w badaniach *in vitro* wykazała, że ppGpp jest inhibitorem prymazy DnaG, w drugiej natomiast, że w warunkach odpowiedzi ścisłej *in vivo* nie następuje zablokowanie syntezy DNA. Te różnice w obserwowanym efekcie ppGpp na syntezę DNA w warunkach *in vitro* i *in vivo* zostały w bardzo przekonujący sposób przedyskutowane w pracy jako potencjalny efekt kompetycji w oddziaływaniu ppGpp z polimerazą RNA. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że w każdej z opublikowanych prac wchodzących w skład pracy doktorskiej Pani Moniki Maciąg-Dorszyńskiej dyskusja przeprowadzona jest w sposób bardzo profesjonalny, świadczący o świetnej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań. Na podkreślenie zasługuje także świetny warsztat badawczy Doktorantki, umiejętność doboru właściwych kontroli eksperymentów oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

#### Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą dokorską Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani Moniki Maciąg-Dorszyńskiej przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek