



Dr hab. Ewa Słomińska  
Katedra i Zakład Biochemii  
eslom@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2019.01.09

**Dziekan Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
Prof. dr hab. Włodzimierz Meissner**

### Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Michała Sobala** pt. „Synteza nukleotydów sygnałowych [(p)ppGpp i (p)ppApp] przez enzym RSH z *Methylobacterium extorquens* AM1”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny ze względów poznawczych. Dotyczy bowiem badań nad syntezą alarmonów, będących pochodnymi nukleotydów guaninowych (p)ppGpp i nukleotydów adeninowych (p)ppApp. Badania nad tą grupą związków trwają już od wielu lat i nadal jest więcej niewiadomych niż potwierdzonych danych. Wiadomo, że odpowiedź ścisła, będąca szeroko rozpowszechnionym mechanizmem regulacyjnym umożliwiającym adaptację bakterii do zmiennych warunków środowiskowych, jest regulowana przez alarmony. To także dzięki syntezie i akumulacji (p)ppGpp komórka jest w stanie przetrwać do czasu eliminacji czynnika stresowego. Wiadomo, że te pochodne nukleotydów guaninowych mają wpływ na szereg procesów fizjologicznych bakterii: a) aktywują szlaki syntezy aminokwasów, mechanizmy odpowiedzialne za naprawę DNA, wirulencję, i b) hamują szlaki odpowiedzialne za syntezę rRNA, tRNA, replikację DNA, translację, biosyntezę lipidów. Jeszcze mniej wiadomo na temat alarmonów, będących pochodnymi nukleotydów adeninowych (p)ppApp. Z dotychczasowych badań wynika, że mogą one działać antagonistycznie do (p)ppGpp.

Tematyka badań i prezentowane w tej rozprawie wyniki są kontynuacją i rozwinięciem badań realizowanych w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii przez zespół promotora rozprawy dr hab. Katarzynę Potrykus.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ dla tego typu monografii, zawiera *Spis treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel i zakres pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Bibliografię*. Zabrakło mi tylko *Wykazu skrótów*, co dla czytającego jest dużym ułatwieniem. Niemniej jednak większość używanych skrótów w rozprawie jest wyjaśniona w tekście.



Wstęp obejmujące 16 stron. Przedstawiono w nim wyczerpujące kompendium wiedzy o odpowiedzi ścisłej, enzymach syntetyzujących i hydrolizujących penta- i tetrafosforany guanozyny a także najważniejsze dane o innych nukleotydach sygnałowych, w tym analogach nukleotydów adeninowych. Przedstawiono także charakterystykę bakterii *Methylobacterium extorquens* AM1. Czytając ten rozdział rozprawy doktorskiej nasunęły mi się trzy pytania:

- 1) czy wiadomo jakie są stężenia powstających u bakterii alarmonów?
- 2) czy powstające pochodne nukleotydów guaninowych i adeninowych w swojej cząsteczce mają tylko rybozę, czy powstają także pochodne deoksyrybozy?
- 3) czy hydroliza reszt fosforanowych w alarmonach dotyczy tylko reszt przy 3 at. C cukru?

Przechodząc do oceny dalszej części rozprawy doktorskiej to uważam, że cele badań postawione są w sposób jasny i przemyślany. Doktorant podjął się trudnego zadania a mianowicie opracowania metody oczyszczania białka RSH z bakterii *M. extorquens* AM1, charakterystyki jego właściwości biochemicznych, a także dokładnej identyfikacji alarmonów syntetyzowanych *in vitro* i *in vivo*.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to Doktorant do realizacji założonych celów badawczych zastosował wiele złożonych i nowoczesnych technik badawczych, w tym: program BLAST, UGENE, fuzji translacyjnej z tagiem SUMO, chromatografii jedno- i dwukierunkowej, chromatografii jonowymiennej i wiele innych. To co zwraca uwagę, to potwierdzenie uzyskanego wyniku za pomocą innej, komplementarnej metody. Napotkane w czasie realizacji badań problemy Doktorant rozwiązywał w sposób niezwykle przemyślany, wybierając inne dostępne techniki badawcze czy rozwiązania komercyjne. Nie wątpię, że był w tym także duży udział Promotora.

Zaskoczeniem dla mnie było stosowanie bardzo wysokich stężeń nukleotydów w eksperymentach, kilku milimolowych. Czy są to stężenia nukleotydów spotykane fizjologicznie w komórkach bakterii? I jak się to ma do stężenia nM użytego izotopu nukleotydu?

Do tej części mam drobną uwagę redakcyjną – szkoda, że stężenia wszystkie związków używanych do wywołania odpowiedzi ścisłej nie podano w jednakowej formie – stężenia części związków podano jako molowe, części jako procentowe. W mojej opinii powinny być ujednolicone.

Wyniki badań przedstawione zarówno na rycinach, tabelach, jaki ich opisy są poprawne i czytelne. Uzyskano oczyszczony natywnie preparat białkowy białka RSH<sub>Mex</sub> 1-352, co jest niewątpliwie dużym osiągnięciem. Ten preparat został wykorzystany do określenia jego charakterystyki biochemicznej. Wykazano, że enzym ten odpowiada za syntezę penta- i tetrafosforanu guanozyny (pppGpp), tetrafosforanu guanozyny (ppGpp) i penta- i tetrafosforanu adenozy (pppApp) a synteza ta jest zależna od obecności kofaktora - dwuwartościowych kationów, szczególnie od jonów kobaltu. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest pierwszy enzym typu RSH posiadający zdolność syntezy pppApp. Badany enzym wykazuje też większe powinowactwo do ATP niż GTP.



Interesujące są także wyniki z badań *in vivo*, pokazujące, że białka RSH<sub>Mex</sub> 1-352 i 1-743 syntetyzują wymienione wyżej alarmony, a pppApp jest także syntetyzowany *in vivo* przez bakterie *Escherichia coli*.

Do tej części rozprawy mam kilka spostrzeżeń i pytań:

- na str.54 napisano, że „jak można zauważyć na rycinie 13...” otrzymano czysty preparat białkowy, a stężenie otrzymanego białka wynosiło 0,186 mg/ml. Natomiast na str. 55 napisano, że „jak można zauważyć na rycinie 13...” uzyskano 11,6 mg/ml preparatu białkowego. Rozumiem, że ten podpis na str. 55 jest redakcyjną pomyłką i chodziło o białko Rel<sub>Seq</sub> 1-385 i rycinie 14.
- czym różni się ryc. 17 i tabela 19? Chyba dotyczą tego samego – pokazują wpływ kationów kobaltu i magnezu na aktywność fragmentu enzymu RSH<sub>Mex</sub> 1-352. To dlaczego pokazano różne wartości – np. dla 6mM Co<sup>2+</sup>?
- dlaczego jest zaskoczeniem, że w reakcji ATP i GDP powstaje GTP, oraz dlaczego w reakcji ATP z GTP powstaje znakowany GTP. Nasuwa się tutaj także pytanie o wydajność tej reakcji – ile powstawało ppGpp a ile GTP
- wydaje się, że przy określaniu względnej aktywności syntetazy pppGpp i użyciu jonów magnezu (rysunek 27) powinno się zwiększyć stężenie ATP – ostatni punkt krzywej nie można uznać za 100% aktywności (brak wysycenia wykresu)

Równocześnie z przedstawionymi rezultatami badań przeprowadzona jest dyskusja wyników. Jest ona ciekawa i dobrze napisana. Oceniając dyskusję mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez Doktoranta dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w rozprawie problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.

Na zakończenie zostały przedstawione najważniejsze wnioski z uzyskanych wyników. Wnioski są prawidłowo sformułowane i w pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń.

Na koniec chciałabym zwrócić uwagę na stosowanie poprawnych określeń, i drobne błędy językowe:

- na str. 12 napisano „...gdzie pierwszym nukleotydem powstającego transkryptu jest guanina” – chodziło o GMP
- czy kilkakrotnie użyty zwrot „komigruje” jest określeniem poprawnym w języku polskim, podobnie jak na str. 46 „motywy HD1 i 6 koordynują guaninę”, czy dalej „koordynuje kationy”

Niemniej jednak te drobne niedociągnięcia (wskazane przez obowiązek recenzenta) nie umniejszają wartości uzyskanych interesujących wyników dotyczących biochemicznych właściwości białka RSH, w tym najważniejszej – zdolności do syntezy nukleotydów sygnałowych [(p)ppGpp i (p)ppApp].



W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Michał Sobala jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami badawczymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów. Jej rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii o dopuszczenie mgr Michała Sobala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę doskonały warsztat doświadczalny Doktoranta, co jest wyróżniające na tym etapie rozwoju naukowego oraz fakt, że uzyskane niezwykle interesujące wyniki z całą pewnością zostaną szybko opublikowane w prestiżowych czasopismach zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Michała Sobala.

Z poważaniem

Dr hab. n. med. Ewa Słomińska