



UNIwersytet  
Warszawski

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



## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Oliwy, pt.

„Analiza strukturalno-funkcjonalna oddziaływania wybranych białek Rep z rejonem DUE origin replikacji DNA”

wykonanej w *Zakładzie Biologii Molekularnej* Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem:

prof. dr. hab. Igora Koniecznego (promotor) i  
dr hab. Katarzyny Węgrzyn (promotor pomocniczy)

Replikacja DNA jest procesem o fundamentalnym znaczeniu, stoi bowiem u podstaw ciągłości życia i ewolucji wszystkich organizmów. Jest to złożony, wieloetapowy proces wymagający skoordynowanego zaangażowania i wzajemnych interakcji wielu czynników komórkowych. Dogodnym modelem w badaniach replikacji DNA są plazmidy bakteryjne, które, jako episomy, zawierają własne, precyzyjnie regulowane systemy pozwalające na zainicjowanie kolejnych rund replikacyjnych. Etap inicjacji replikacji odgrywa szczególną rolę, bowiem determinuje on zarówno liczbę kopii danego replikonu, zakres jego gospodarzy, jak i przebieg kolejnych etapów powielania DNA. Mimo, iż poświęcono temu zagadnieniu wiele badań, aktualna wiedza o molekularnych aspektach inicjacji replikacji jest wciąż niepełna. Kontynuacja badań z tego zakresu jest zatem w pełni zasadna, tym bardziej, że rozwój technik i metod molekularnych pozwala na stawianie nowych pytań oraz rozwiązywanie bardziej złożonych problemów badawczych.

W ocenianej rozprawie doktorskiej badaniom poddano trzy modelowe replikony iteronowe – plazmid RK2, charakteryzujący się szerokim zakresem gospodarzy, plazmid F pochodzący z *Escherichia coli* oraz plazmidopodobny profag P1. Replikony te kodują specyficzne białka inicjatorowe (odpowiednio, TrfA, RepE i RepA) – ich przyłączenie do iteronów w obrębie origin zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń, która, poprzez destabilizację i rozplecenie podwójnej helisy DNA w rejonie DUE (ang. *DNA unwinding element*), prowadzi do powstania kompleksu otwartego i zainicjowania replikacji DNA. Doktorantka postawiła sobie za cel ambitne zadanie, jakim było zbadanie oddziaływań ww. białek inicjatorowych z powstałym jednoniciowym DNA rejonów DUE. Zachętą do podjęcia tych badań były doniesienia świadczące o możliwości występowania tego typu interakcji w różnych układach, jednak struktura i funkcja powstających kompleksów nie zostały dokładnie zdefiniowane.

Należy zaznaczyć, że oceniana rozprawa powstała w wyniku realizacji większego projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Sonata 13). Doktorantka na wstępie określiła dokładnie zakres przeprowadzonych przez nią prac, co było istotne, bowiem wyniki rozprawy przedstawiono w szerszym kontekście, na tle osiągnięć całego Zespołu badawczego – analogicznie jak ma to miejsce w przypadku rozpraw prezentowanych w formie tzw. „zszywek” opublikowanych wieloautorskich prac badawczych. Z pewnością ułatwiło to opis i dyskusję wyników, a drugiej strony przyniosło informację świadczącą o kluczowej roli Doktorantki w sfinalizowaniu badań całego projektu. Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w ubiegłym roku w uznanym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* (podany w rozprawie tytuł pracy nie jest tożsamy z tytułem opublikowanego artykułu - str. 3 i 106), zatem przeszły one już rygorystyczną ocenę ekspercką.

W pierwszym etapie badań postawiono za cel zdefiniowanie reszt aminokwasowych białek Rep, mogących potencjalnie wchodzić w interakcje z jednoniciowym DNA rejonu DUE. Nie było to łatwe zadanie m.in. ze względu na brak rozwiązanych struktur krystalograficznych RepA i TrfA. Wykorzystując oczyszczone białko RepA i DNA rejonu DUE profaga P1, Doktorantka przeprowadziła wstępnie reakcję sieciowania kompleksów nukleoproteinowych powstających z ssDNA origin, a wybrane po rozdiale elektroforetycznym próby poddała analizie przy użyciu spektrometrii mas MALDI-TOF. Analogiczne badania przeprowadzono także w Zespole dla pozostałych dwóch układów badawczych (RepA i TrfA), a zbiorczym efektem tych działań było potwierdzenie sieciowania w przypadku kilku wytypowanych peptydów. Uzyskane dane, w połączeniu z dogłębną analizą struktury krystalograficznej kompleksu nukleoproteinowego RepE z ssDNA origin F, analizą struktur drugorzędowych badanych białek oraz analizami sekwencji *in silico*, doprowadziły do wytypowania aminokwasów, które mogą potencjalnie determinować oddziaływania analizowanych białek z jednoniciowym DNA rejonu DUE macierzystych plazmidów.

Do realizacji kolejnych zadań projektu konieczne było przygotowanie i oczyszczenie zmodyfikowanych wariantów analizowanych białek Rep (z odpowiednio zaprojektowanymi substytucjami wspomnianych wyżej aminokwasów), a także kilku innych białek powiązanych z procesem inicjacji replikacji. Zmodyfikowane białka Rep, po przeanalizowaniu metodą dichroizmu kołowego, wykorzystano w dalszych badaniach, które obejmowały (w przypadku modelu RK2): (1) zbadanie zdolności inicjacyjnych zmutowanych wariantów białka TrfA z wykorzystaniem metody replikacji DNA *in vitro*, (2) określenie możliwości oddziaływania wariantów TrfA z helikazą, (3) zbadanie ich wpływu na otwieranie rejonu DUE w obrębie *origin* replikacji, a także (4) ich interakcji z jedno- i dwuniciowym DNA origin. Efektem tych badań była identyfikacja wariantów TrfA niezdolnych do zainicjowania replikacji, które nie były w stanie ani aktywować helikazy DnaB (mimo iż, jak wykazała Doktorantka, oddziaływały one z tym enzymem), ani warunkować otwarcia *origin* replikacji w rejonie DUE, nie były też w stanie oddziaływać z jednoniciowym DNA DUE. Część tych badań przeprowadzono również z udziałem wariantów białek RepE bądź RepA, co pozwoliło uzyskać pełniejszy obraz analizowanych interakcji.

W rezultacie, Doktorantka zidentyfikowała reszty aminokwasowe białek inicjatorowych wchodzące w interakcje z ssDNA DUE oraz wykazała, że oddziaływania te mają kluczowe znaczenie w procesie otwierania origin replikacji. Niektóre wątki badań były dalej rozwijane przez innych członków Zespołu w ramach wspomnianego wcześniej projektu, co, w efekcie, dostarczyło jednoznacznych dowodów (eksperymentalnych i strukturalnych) świadczących o zaangażowaniu dzikiego białka inicjatorowego w jednoczesne interakcje z dsDNA (iterony) i ssDNA (DUE) w regionie origin. Wyniki te wskazują na poprawność jednego z dwóch proponowanych modeli oddziaływań białek Rep z ssDNA z DUE (modelu odwróconej pętli), co jest istotnym wkładem w rozwój badań nad procesem inicjacji replikacji DNA. Doktorantka prowadziła badania na modelu episomów, jednak dostępne dane wskazują na podobny charakter przebiegu inicjacji replikacji również w przypadku origin chromosomów bakteryjnych, co świadczy o uniwersalnym wymiarze wyników rozprawy. Wyniki te zostały skonfrontowane z aktualnymi danymi literaturowymi oraz poddane dojrzałej i krytycznej dyskusji, która jest równie mocną stroną rozprawy.

Przedstawiony wyżej syntetyczny opis działań eksperymentalnych nie odzwierciedla stopnia trudności i złożoności przeprowadzonych badań pod względem metodycznym i technicznym, oraz ogromnego nakładu pracy jaki włożyła Doktorantka w przeprowadzenie ciągu złożonych eksperymentów. W badaniach zastosowano liczne, często wieloetapowe zaawansowane procedury i metody z zakresu biochemii, genetyki i biologii molekularnej, niejednokrotnie wymagające optymalizacji i weryfikacji wyników z wykorzystaniem alternatywnych podejść eksperymentalnych. Dzięki precyzyjnemu zaprojektowaniu ciągu eksperymentów, wykorzystaniu dobrego warsztatu badawczego oraz zastosowaniu odpowiednich kontroli, Doktorantka uzyskała rzetelne wyniki uprawniające do wyciągnięcia przedstawionych w rozprawie wniosków.

#### Ocena układu i strony formalnej rozprawy

Rozprawa została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania o typowym układzie treści, z wyróżnieniem Streszczenia (w języku polskim i angielskim), Wstępu, Celu pracy, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji i Bibliografii. W rozprawie zamieszczono również Indeks stosowanych skrótów, a także końcowy rozdział zawierający Wyniki uzupełniające.

Doktorantka we Wstępie zarysowała tematykę rozprawy. Po krótkim wprowadzeniu, podkreślającym uniwersalny charakter mechanizmów powielania informacji genetycznej, skoncentrowała uwagę na molekularnych aspektach procesu inicjacji replikacji bakteryjnego DNA. Zaprezentowała główne modele chromosomowych i plazmidowych systemów replikacyjnych, podsumowała aktualny stan wiedzy na temat kompleksów nukleoproteinowych powstających w origin, a w końcowej części podkreśliła aspekty wymagające dalszych badań, do czego bezpośrednio nawiązuje sprecyzowany przez nią Cel pracy. Wybór tych treści był w pełni zasadny i stanowił dobre wprowadzenie do problematyki badań.

W następnych rozdziałach przedstawiono wykorzystane w pracy materiały i metody – ich opisy są szczegółowe i wyczerpujące. Cała rozprawa została napisana zwięźle, bardzo dobrym

językiem, z dużą precyzją w formułowaniu myśli, a w końcowym etapie została poddana starannej edycji. Nie mniej jednak, znalazłem w niej kilka drobnych uchybień, o których, jako recenzent, powinienem wspomnieć. Niżej podaję kilka przykładów:

- praca została napisana w języku polskim, zatem w zapisie liczb dziesiętnych przecinek (a nie kropka) powinien oddzielać całości od części ułamkowych (uwaga ta dotyczy całej pracy);
- str. 14: właściwa nazwa trzech domen to Bacteria, Archaea i Eucarya (a nie „Archeony, Bakterie i Eukarionty”);
- str. 78: pierwotnym źródłem RepA jest plazmidopodobny profag P1, a nie „bakteriofagowy plazmid P1”;
- nie znajduję w tekście odniesień do Ryciny 2, ponadto Ryciny nr 18 i S 9.4 nie są w pełni czytelne ze względu na oznaczenie krzywych podobnym odcieniem szarości, a na Rycinie 9 nie odnajduję miejsca wiązania białka Fis;
- w kilku przypadkach podano w tekście nieodpowiednie numery podrozdziałów, np. 5.16 (zamiast 5.17) czy 5.14.2 (zamiast 5.15.2) – np. str. 78;
- str. 60: nadprodukcję DnaA uzyskano w szczepie *E. coli* JP313 – szczep ten nie został ujęty w spisie w rozdz. Materiały (podrozdz. 4.1.);
- str. 33: powinniśmy mówić o liczbie kopii plazmidów, a nie „ilości kopii”; a także o wiązaniu białka z DNA a nie „wiązaniu do DNA” (np. str. 18);
- str. 42: czy rzeczywiście gen *k* koduje białko DnaA?; pBAD24 zawiera promotor operonu arabinozowego, a nie „promotor arabinozowy”; fenotypy oporności na antybiotyki determinowane plazmidowo oznacza się zwyczajowo kodem dwu- a nie trzyliterowym, ponadto zapisy „gen oporności na Amp<sup>r</sup>” czy „oporność na Amp<sup>r</sup>” nie są poprawne;
- w tekście pojawiają się określenia „ogon histydynowy / fistydynowy” (str. 42) i „znacznik histydynowy” (np. str. 59) – osobiście preferuję drugie z wymienionych;
- str. 64: do roztworu dodawano „szczyptę” lizozymu – należy unikać w tekstach naukowych tak nieprecyzyjnych określeń.

Są to drobne uwagi, które absolutnie nie rzutują na moją wysoce pozytywną ocenę całości rozprawy. Uważam, że zdefiniowanie interakcji białek Rep z jednoniciowym DNA rejonu DUE oraz zademonstrowanie istotności tych interakcji dla przebiegu kolejnych etapów inicjacji replikacji DNA mają fundamentalne znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmu powielania informacji genetycznej w komórkach bakterii.

Aby zainicjować szerszą dyskusję podczas obrony rozprawy, poprosiłbym Doktorantkę o rozwinięcie dwóch wątków:

1) Jedną z głównych funkcji białek Rep jest zapewnienie prawidłowego umiejscowienia i aktywowanie helikazy w origin. Interakcje obu białek wydają się mieć zasadnicze znaczenie dla kierunku przebiegu replikacji. Nie mniej jednak, nawet w grupie pokrewnych plazmidów (np. replikonów *repABC* *Alphaproteobacteria*), których systemy replikacyjne są wysoce konserwowane pod względem struktury i sekwencji, obserwuje się pewne zróżnicowanie – niektóre z nich replikują się jedno- a inne dwukierunkowo. Ciekawi mnie, czy wiedza na temat interakcji plazmidowych białek inicjatorowych z helikazą, znajomość struktury tych białek oraz kompleksów

nukleoproteinowych, a także organizacji samego origin, pozwala wnioskować o kierunkowości replikacji. Czy stosując podejście *in silico* możemy z dużą dozą prawdopodobieństwa przewidzieć, czy dany plazmid replikuje się jedno- czy dwukierunkowo?

2) Ponieważ rozprawa jest podstawą wnioskowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie biotechnologia, poprosiłbym Doktorantkę o podkreślenie biotechnologicznych aspektów przeprowadzonych badań – tego wątku zabrakło w dyskusji rozprawy.

### **Wniosek końcowy**

Uważam, że oceniana rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy i przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było określenie struktury i funkcji oddziaływań białek inicjatorowych plazmidów z jednoniciowym DNA origin plazmidów iteronowych. Rozwiązanie tego problemu wymagało od Doktorantki rozległej wiedzy teoretycznej, opanowania złożonego, specjalistycznego warsztatu badawczego, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz dokonania syntezy uzyskanych danych i wyciągnięcia na ich podstawie odpowiednich wniosków.

W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym, zwracam się do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Oliwy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia.

Biorąc pod uwagę istotność i ogólnobiologiczny wymiar uzyskanych wyników oraz opublikowanie ich części w prestiżowym czasopiśmie naukowym, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

