

Warszawa, 25.11.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Oliwa pt. „
Analiza strukturalno-funkcjonalna oddziaływania wybranych białek Rep
z rejonem DUE origin replikacji DNA”.**

Rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Biologii Molekularnej w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Igora Koniecznego oraz promotora pomocniczego dr hab. Katarzyny Węgrzyn. Zakład ten już od wielu lat, z dużym powodzeniem, zajmuje się badaniem mechanizmów replikacji bakterii jak i pozachromosomalnych elementów genetycznych.

Przedstawiona rozprawa napisana jest w języku polskim, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. Zawiera również: wstęp, opis celu pracy, omówienie stosowanych materiałów i metod, wyników otrzymanych przez Doktorantkę, dyskusję wyników, bibliografię oraz opis wyników otrzymanych przez innych badaczy ale pochodzących ze wspólnej publikacji Węgrzyn i wsp., 2023 *Nucleic Acids Res.*, 51(19) 10551-10567, ściśle związanych z omawianą przez doktorantką tematyką. Przedstawione są również skróty używane w pracy.

Wyczerpujący i przejrzysty Wstęp, opisujący mechanizmy inicjacji replikacji w komórkach eukariota, archeonów i bakterii, jest starannie przygotowany pod względem edytorskim, ilustrowany dziesięcioma rysunkami.

Rozdziały Materiały i Metody szczegółowo opisują szczepy bakteryjne, plazmidy, oligonukleotydy, podłoża, antybiotyki, bufony, odczynniki, materiały dostępne komercyjnie oraz imponującą liczbę technik użytych podczas zaprezentowanych doświadczeń.

Przedstawione w pracy doktorskiej badania są częścią projektu SONATA 13 2017/26/D/NZ1/00239 oraz częścią pracy opublikowanej w *Nucleic Acids Research* (Węgrzyn i wsp. z 2023 roku). W publikacji tej Pani Monika Oliwa jest drugim autorem. Dodanie opisu wyników i wniosków otrzymanych przez innych autorów, ale ściśle wiążących się z tematyką pracy doktorskiej, jest dobrym pomysłem ponieważ ułatwia czytanie i ocenę w szerszym kontekście.

Mechanizmy inicjujące replikację, zarówno chromosomalnego DNA jak i pozachromosomalnych elementów genetycznych, od wielu lat są przedmiotem genetycznych, biochemicznych czy strukturalnych badań. Zidentyfikowanie kompleksów nukleoproteidowych z ssDNA rejonu inicjującego replikację, opublikowane struktury inicjatorów replikacji z ssDNA i dsDNA, poszerzyły naszą wiedzę na temat mechanizmu inicjacji replikacji ale nie dały odpowiedzi na wszystkie pytania. Rozprawa przedstawiona przez mgr Monikę Oliwę stanowi próbę odpowiedzi na związane z tą tematyką pytania.

Cel Pracy, choć dość ogólny, opisuje kierunek badań podjętych w ramach projektu doktorskiego.



Doktorantka starała się zbadać znaczenie poszczególnych aminokwasów w strukturze białek inicjatorowych Rep dla efektywnej inicjacji replikacji plazmidów iteronowych, często towarzyszących bakteriom Gram-ujemnym. Do badań wybrano trzy białka inicjatorowe: TrfA, dla plazmidu RK2, białko RepE dla plazmidu F oraz białko RepA dla bakteriofagowego plazmidu P1. W rozprawie opisano głównie analizy dotyczące białka TrfA.

Badania zostały rozpoczęte od identyfikacji reszt aminokwasowych białek Rep istotnych dla wiązania do ssDNA rejonu DUE (ang. DNA unwinding element). Doktorantka przeprowadziła sieciowanie białka RepA z fragmentami ssDNA i analizę widma MALDI-TOF, które to wskazywały na istotną funkcję aminokwasów od 122 do 130 domeny WH2 białka RepA. Słaba jakość otrzymanych plików i widma nie pozwoliła na dokładne podanie sekwencji rejonu białka. Nie powiodła się również analiza krystalograficzna. Analizując silnie konserwowaną, drugorzędową strukturę białek Rep, dane z modelowania *in silico* białka TrfA z ssDNA i dsDNA, wyniki MALDI-TOF dla TrfA i RepE i struktury krystalograficzne RepE z ssDNA, wytypowało potencjalne aminokwasy białek TrfA i RepA istotne dla oddziaływania z ssDNA DUE. Wyznaczone aminokwasy uznane za kluczowe na etapie otwierania *origin* replikacji czy utrzymania stabilnego kompleksu otwartego Doktorantka poddała ukierunkowanej mutagenzie. Otrzymane zmienione warianty białek inicjatorowych zostały oczyszczone i użyte w dalszych strukturalno-funkcjonalnych badaniach. Były to warianty TrfA: K127E, R194E, R259E; RepA: Y190E, Q195E, R200E, R269E oraz dwa warianty białka RepE: WT oraz F146E. Inne analizowane warianty białek Rep były dostępne w kolekcji macierzystego laboratorium. Aby móc przeprowadzić dalsze analizy Doktorantka oczyściła również białka powiązane z procesem inicjacji replikacji - DnaA, DnaB, DnaC oraz gyrazę, natomiast białko HU i SSB były dostępne w kolekcji laboratorium.

Wyniki analiz widma dichroizmu kołowego wykazały brak zaburzeń w strukturze drugorzędowej badanych wariantów białka TrfA i RepE w porównaniu do białek typu dzikiego.

Analiza aktywności replikacyjnej plazmidu *in vitro oriV* w ekstrakcie bakteryjnym zmutowanych form TrfA wykazała, że jedynie K303E jest aktywny replikacyjnie a warianty R156E, R327E i R347E nie.

Następnie Doktorantka zbadała czy brak syntezy DNA jest związany z zaburzonym oddziaływaniem Rep-DnaB czy też wpływem na aktywność helikazy. Aktywność helikazy zaobserwowano dla wariantów K303E i R347E, natomiast nie zaobserwowano aktywności helikazy DnaB dla wariantów TrfA R156E i R327E. Co ciekawe, Doktorantka wykazała również, że wszystkie warianty TrfA oddziałują z helikazą DnaB.

Ze względu na brak możliwości skonstruowania i oczyszczenia odpowiedniej matrycy, nie przeprowadzono testu aktywności helikazy dla wariantów białka RepA. Wyniki opisane w pracy Węgrzyn i *wsp.* 2023 wskazują również na brak zaburzeń w oddziaływaniu z helikazą w analizowanych wariantach RepE.

Innym problemem w inicjacji replikacji może być zaburzenie otwierania dsDNA w rejonie DUE. Aby to sprawdzić, Doktorantka przeprowadziła analizę otwierania *origin* replikacji *oriV* i *oriS* w obecności badanych wariantów białka TrfA lub RepE. W przypadku TrfA, R156E i R327E zaobserwowała brak powstania fragmentów ssDNA a więc otwarcia *origin* replikacji, natomiast w przypadku wariantu TrfA K303E zaobserwowała otwarcie *origin oriV* jak w przypadku TrfA typu dzikiego. Otwieranie *origin* replikacji nastąpiło również w obecności wariantów RepE WT i RepE Q171E, natomiast zaburzone otwieranie *origin* replikacji wystąpiło dla wariantów RepE F146E i

RepE Y172E. Podobnie, jak w poprzednich doświadczeniach, brak możliwości otrzymania odpowiedniej matrycy DNA, uniemożliwił przeprowadzenie tego typu reakcji w przypadku wariantów białka RepA.

Odpowiedni wybór zmienionych aminokwasów w białkach inicjatorowych miał na celu sprawdzenie, które z nich są kluczowe w oddziaływaniach białek Rep z ssDNA i dsDNA. Testy, które miały odpowiedzieć na te pytanie Doktorantka przeprowadziła dla wariantów TrfA i RepA. Analiza typu EMSA, analizująca opóźnienie migracji prążka w żelu wykazała, że w przeciwieństwie do TrfA R156E i R327E, zarówno TrfA K303E jak i R347E oddziałują z ssDNA rejonu DUE *oriV*. Wszystkie analizowane warianty białka, oprócz TrfA R347E, tworzyły kompleksy z dsDNA.

Analiza oddziaływania wariantów białka RepA wykazała oddziaływanie z ssDNA wariantów R191E, R245E, K266E i niewspomnianego wcześniej wariantu Q220E/N221E. Zgodnie z wcześniejszymi danymi literaturowymi wariant R245E nie oddziaływał z dsDNA. Analiza oddziaływań TrfA R156E oraz R327E, przeprowadzona przy współpracy z dr Katarzyną Bury, przy użyciu mikroskopii sił atomowych nie wskazała na tworzenia się kompleksów pomiędzy cząsteczkami białek i kwasów nukleinowych. Wobec niejasności otrzymanych wyników Doktorantka przeprowadziła badania oddziaływań molekularnych z użyciem Plazmonowego Rezonansu Powierzchniowego SPR. Zwiększenie sygnału sugerujące na wiązanie z ssDNA obserwowano dla R347E oraz K303E. Wynik sugerujący zwiększone wiązanie do dsDNA otrzymano dla wszystkich, oprócz wariantu R347E, wariantów białka TrfA.

Doktorantka w rozprawie potwierdza również przeprowadzenie analizy SPR dla wariantów białka RepA, ale odpowiednich wyników nie znalazłam.

Opisane wyniki wskazały które aminokwasy białek Rep są kluczowe w procesie otwierania *origin*, prawidłowych oddziaływań z z ssDNA i właściwego funkcjonowania helikazy.

W rozdziale Dyskusja mgr Monika Oliwa podsumowuje wyniki otrzymane dla różnych białek Rep i porównuje je z danymi literaturowymi. Porównania te i wyciąganie wniosków jest czasem trudne ze względu na niepełną jednak analizę funkcjonalno-strukturalną dla trzech białek inicjatorowych. Doktorantka słusznie opiera dyskusję na analizie struktur krystalicznych zaprezentowanych w pracy Węgrzyn i wsp z 2023 roku (w której Doktorantka jest drugim współautorem). W pracy tej wykorzystując sieciowanie połączone ze spektrometrią mas (MS), analizę zmienionych białek i struktur krystalicznych, zaproponowano które reszty aminokwasowe są odpowiedzialne za interakcję pomiędzy plazmidowymi białkami inicjatorowymi a jednoniciowym DNA podczas procesu inicjacji replikacji. Analiza struktur krystalicznych białka RepE w kompleksie z ssDNA DUE, a także struktury potrójnego kompleksu dsDNA-RepE-ssDNA pozwoliła na zaproponowanie modelu inicjacji replikacji DNA wskazującego na słuszność modelu według mechanizmu odwróconej pętli (ang. loop-back model). Według Recenzentki w zaprezentowanej dyskusji nie zabrakło powtórzeń z rozdziału Wyniki.

Chciałabym prosić Doktorantkę o przygotowanie (na podstawie własnych danych oraz danych literaturowych) podsumowania (w postaci Tabeli czy graficznie), wyszczególnienie aminokwasów białek Rep istotnych dla oddziaływania z rejonem DUA, wskazanie ich roli w inicjacji, porównania z wynikami literaturowymi dla innych białek inicjatorowych, zaprezentowania do jakiego stopnia otrzymane wyniki potwierdzają wspólny model inicjacji replikacji analizowanych plazmidów. A co za tym idzie, chciałabym poprosić również o wskazanie argumentów przemawiających przeciw i za modelem loop-back inicjacji replikacji. Zdaje sobie sprawę, że



Doktorantka zawarła te informacje w Dyskusji, ale korzystny byłby np. schematyczny, podsumowujący rysunek. Chciałabym również zapytać czy można przytoczyć dane sugerujące udział filamentów Rep i bakteryjnego białka DnaA w procesie inicjacji replikacji plazmidowego DNA lub czy sa planowane badania mogące odpowiedzieć na te pytanie.

Podsumowując, przeprowadzone przez Doktorantkę analizy (replikacji *in vitro*, aktywności helikazy DnaB, otwierania *origin* replikacji, oddziaływań z ssDNA i dsDNA) wskazują na istotną rolę poszczególnych aminokwasów białek Rep w procesie inicjacji replikacji plazmidu. Otrzymane dane umożliwiły zaproponowanie modelu inicjacji replikacji badanych plazmidów.

W zaprezentowanej rozprawie Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową, znajomością najnowszej literatury naukowej, a także znajomością różnorodnych technik. W mojej ocenie, Doktorantka prawidłowo zinterpretowała otrzymane wyniki i wyciągnęła interesujące wnioski.

Rozprawa doktorska Pani Moniki Oliwa opisuje nowatorskie, ważne i ciekawe badania. Doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane oraz opisane w przejrzysty sposób. Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, zdecydowanie poszerzają wiedzę na temat inicjacji replikacji plazmidowego DNA. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością prowadzenia pracy laboratoryjnej. Przedstawiam pozytywną ocenę pracy gdyż praca ta spełnia ustawowe wymogi i warunki określone w ustawie z dn. 14.03.2003 (Dz.U. nr 65 poz. 595) Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z późniejszymi zmianami stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska