



dr. hab Anna Pawlik
tel. 071-3709949
e-mail: anna.pawlik@hirszfeld.pl

Wrocław, 18.11.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Oliwy

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

Rozprawa doktorska mgr Moniki Oliwy została wykonana pod opieką promotora prof. dr hab. Igora Koniecznego oraz promotor pomocniczej dr hab. Katarzyny Węgrzyn, w zespole, który specjalizuje się m.in. w badaniu inicjacji replikacji plazmidów. Rozprawa przedstawia wyniki badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu tworzenia kompleksów inicjujących replikację plazmidów, w szczególności scharakteryzowania strukturalno-funkcjonalnego oddziaływania plazmidowych białek inicjatorowych Rep z jedno- i dwuniciowym DNA regionów *ori* plazmidów iteronowych.

Badania nad replikacją chromosomów i plazmidów bakteryjnych prowadzone są od wielu lat w wielu ośrodkach naukowych na świecie. Oddziaływanie białek inicjatorowych z DNA odgrywa kluczową rolę w rozpoznaniu/naznaczeniu miejsca inicjacji replikacji DNA, w otwarciu helisy DNA a następnie w zamontowaniu wielopodjednostkowego kompleksu replikującego chromosom lub plazmid. Poznanie dokładnej struktury kompleksu oraz roli inicjatora w otwarciu helisy i stabilizacji ssDNA, a następnie montażu następných białek jest wciąż aktualnym zagadnieniem badawczym, szczególnie w kontekście zróżnicowanych struktur białek inicjatorowych, w tym białek plazmidowych. Dlatego podjęcie badań przez Doktorantkę jest w pełni uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr Oliwy ma formę monografii. Zawiera wszystkie treści niezbędne do jej rzetelnej oceny, w tym aspektów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce jako niezbędnych do nadania stopnia doktora - prezentowania ogólnej wiedzy Doktorantki, wykazania umiejętności Doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz wskazania na to, czy samodzielnie rozwiązała problem naukowy.

Doktorantka w rozbudowanym, ale zwięzłym tematycznie Wstępie rozprawy przedstawiła zagadnienia tworzenia kompleksów replikacyjnych chromosomów eukariotycznych, archeonów, bakterii oraz kompleksów replikacyjnych plazmidowych. Ten rozdział przedstawia wiedzę Doktorantki w zakresie inicjacji replikacji materiału genetycznego, ale także wskazuje na to, że temat tworzenia kompleksów inicjujących replikację plazmidów Doktorantka rozważa w szerszym aspekcie niż tylko replikacji plazmidów. To ma duże znaczenie dla przeprowadzenia badań, ale przede wszystkim ich analizy w szerokim kontekście biologicznym. Wstęp, podobnie jak znaczna część rozprawy doktorskiej, napisany został poprawnym językiem naukowym, opatrzony rysunkami ułatwiającymi śledzenie tematu rozprawy. Nieliczne błędy językowe czy terminologiczne nie przeszkadzają w czytaniu i zrozumieniu pracy. Jedynie część Materiałów i Metod budzi pewne zastrzeżenia, ponieważ nagromadziły się tam błędy prawdopodobnie wynikające z zamiany jednostek masowych na molowe (np. 100 mM ampicylina zamiast 100 µg/ml np. str. 60-61), przedstawienia liter w nazwach odczynników (cyjanol ksnyelowy str. 50) lub ich skrótów (np. acetonitryl (CAN) str. 50, ale ACN na str. 67). Rozdziały Materiały i Metody są przedstawione bardzo dokładnie i rzetelnie, chociaż są fragmenty wymagające



doprecyzowania. Szczególnie istotne byłoby podanie np. numerów katalogowych lub pochodzenie (np. publikacja z opisem metody uzyskania) przeciwciał i enzymów (np. II-rzędowego przeciwciała antykróliczego IgG sprzężonego z HRP, fosfatazy kreatynowej (w pracy błędnie nazwanej keratynową), kinazy kreatynowej czy trypsyny używanej w spektrometrii mas). Zauważyłam też błędnie podane parametry niektórych analiz, brak składu niektórych roztworów lub błędne odwołania między rozdziałami (np., dla czystego DNA stosunek A260/A280 powinien wynosić około 2-2.2 (Technical Note 52646 spektrofotometru Nanodrop 2000), a nie jak podano w pracy $\geq 1,8$ str. 58; brak składu roztworów używanych do barwienia srebrem w podanym rozdziale 4.10; błędne odwołanie do rozdziału (5.16 na str. 78). Te uchybienia mogłyby wprowadzać w błąd raczej początkujących niż doświadczonych badaczy. Wskazuję na nie z obowiązku recenzenta i potencjalnego zainteresowanego powtórzeniem badań, bo precyzja w opisie metod jest niezwykle ważna dla powodzenia powtórzenia analiz.

Cel pracy jest sprecyzowany i realizowany. Jednak zaznaczyć należy, że chociaż Doktorantka bardzo ambitnie rozpoczęła badania wszystkich białek replikacyjnych i ich wariantów (TrfA, RepE i RepA), to analizy funkcjonalne wykonała dla wybranych białek i ich wariantów, co odzwierciedlono w tytule rozprawy. Niemniej jednak Doktorantka zastosowała szereg metod biochemicznych, biologii molekularnej i biologii strukturalnej, aby przygotować materiał badawczy (zaprojektować warianty białek, oczyścić białka inicjatorowe i ich warianty oraz białka replikacyjne, wyizolować plazmidy i fragmenty DNA), a następnie dokonać analizy oddziaływania wybranych białek inicjatorowych z dwuniciowym (ds) i jednoniciowym (ss) DNA. Zaznaczyć należy, że Doktorantka prowadząc swoje badania uczestniczyła w realizacji szerszej zakrojonego projektu badawczego Sonata 13 kierowanego przez dr hab. Katarzynę Węgrzyn. Wyniki Doktorantki stanowią istotny wkład w badania projektu, na co wskazuje wykorzystanie niektórych z nich w publikacji Węgrzyn i wsp., NAR 2023. Warto podkreślić, że wykonanie przedstawionych w rozprawie doktorskiej prac i analiza danych wymagały od Doktorantki opanowania wielu technik badawczych, ale przede wszystkim wykonania żmudnych prac przygotowawczych (np. izolacja >20! białek rekombinowanych) „owocujących” dopiero w końcowych etapach badań. Taki cykl pracy wymagał zapewne od Doktorantki systematyczności i ogromnej cierpliwości, zanim jej praca została nagrodzona uzyskaniem odpowiedzi na pytania postawione w pracy. Praca w projekcie naukowym, w którym zadania członków zespołu, w tym Doktorantki, przenikają się wzajemnie, musiała być wyzwaniem organizacyjnym, również dla Doktorantki.

Wyniki uzyskane w pracy są dobrze opisane, przedstawione w postaci rysunków i tabel, udział osób trzecich został właściwie zaznaczony. Brakowało mi podsumowania ciągu eksperymentów schematem, pozwalającym śledzić prace i wyniki Doktorantki w poszczególnych etapach analiz, oraz podsumowania wyników w postaci tabeli lub rysunku lub chociażby rozdziału „Podsumowanie wyników” czy „Wnioski”, które pozwoliłyby podkreślić tą część wyników, która jest bezpośrednio wynikiem pracy Doktorantki.

Po zapoznaniu się z pracą stwierdzam, że do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy:

- Oczyszczenie aktywnych wariantów białek Rep (21 preparatów), z których siedem Doktorantka zaprojektowała samodzielnie i przygotowała ich konstrukty ekspresyjne



- Zidentyfikowanie aminokwasów TrfA odpowiedzialnych za oddziaływanie z ssDNA i dsDNA. Doktorantka wykazała, że aminokwasy R156, R327 białka TrfA są odpowiedzialne za oddziaływanie z ssDNA, a zaburzenie tego oddziaływania uniemożliwia rozplecenie helisy w regionie *oriV*, przy czym Doktorantka wykluczyła upośledzenie oddziaływania tych wariantów z DnaB. W analogicznych analizach Doktorantka wykazała, że mutacja reszty R303 nie ma wpływu na wiązanie ssDNA i dsDNA ani na rozplecenie DNA i montowanie helikazy do oczka replikacyjnego.
- Wykazanie, że warianty RepE F146E i Y172E nie wykazują zdolności rozplatania *oriS*
- Wykazanie, że wariant RepA R245E nie oddziałuje z dsDNA, pomimo oddziaływania z ssDNA
- Potwierdzenie, że białka inicjatorowe TrfA i RepA posiadają odmienne regiony oddziałujące z ssDNA i dsDNA.

Doktorantka w rozdziale Dyskusja szeroko, dojrzałe, poprawnym językiem naukowym rozważa proces tworzenia kompleksów inicjujących replikację plazmidów w kontekście wszystkich badanych w projekcie białek inicjatorowych i wyników uzyskanych w projekcie Sonata. W szczególności dyskutuje tworzenie kompleksu inicjacyjnego w kontekście oddziaływania białek inicjatorowych z dsDNA i ssDNA oraz dwóch proponowanych obecnie modeli struktury kompleksu inicjacyjnego: „two-state model” zaproponowany pierwotnie przez zespół prof. Bergera i „loop-back” zaproponowany przez zespół prof. Katayamy. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę, przedstawione w publikacji Węgrzyn i wsp., NAR 2023 oraz w rozprawie doktorskiej stanowią samodzielne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnoszą wkład do wciąż trwającej wśród naukowców dyskusji dotyczącej struktury kompleksów inicjujących replikację chromosomów i plazmidów.

W trakcie czytania rozprawy nasunęły mi się pytania dotyczące wyników, ale także części technicznej pracy. Proszę Doktorantkę o komentarz.

Pytania dotyczące wyników i ich analiz:

- Proszę o doprecyzowanie, które warianty białka RepA Doktorantka zaprojektowała i oczyściła, ponieważ nieścisłości między Tab. 7, Tab. 8 oraz tekstem na str. 85 nie pozwalają jednoznacznie tego stwierdzić.
- Na Ryc. 15 pokazano widma CD wybranych wariantów białek TrfA-33 i RepE (14 z białkami typu WT), brak jest widm pozostałych wariantów TrfA i RepE oraz nie ma żadnego widma białka RepA. Czy badano pozostałe warianty i jeśli tak, to jakie wyniki uzyskano?
- W jaki sposób wariant TrfA R347E doprowadza do powstania formy F* (Ryc. 17) jeśli nie oddziałuje z dsDNA (Ryc. 21 B)?
- Jak można wytłumaczyć zmniejszenie objętości cząsteczek TrfA R156E i w mniejszym stopniu R327E po dodaniu ssDNA (Ryc. 22)? Czy te warianty mogą tworzyć struktury/formy czwartorzędowe inne niż białko WT, bo objętość ich jest większa niż białka WT? Ponadto w opisie analizy AFM podano, że tworzenie kompleksów TrfA-ssDNA stwierdzono tylko w przypadku białka WT, ale analiza Ryc. 22 wskazuje, że również podobny efekt zaobserwowano dla wariantu R347E, co jest zgodne z wynikiem analizy EMSA (Ryc. 21A).



- Doktorantka nie zamieściła wyników analizy oddziaływania RepA i jego wariantów z DNA metodą SPR, chociaż takie wyniki są przywoływane w pracy (np. str. 108).
- Na Ryc. 21 niektóre warianty RepA tworzą z ssDNA dwa rodzaje kompleksów a niektóre jeden. Proszę porównać np. WT, R191E i Q220E/N221E z R245E i K266E (wszystkie analizy z oriP_{DUE}bottom). Czy to może mieć jakieś znaczenie funkcjonalne dla tworzenia kompleksu?

Pytania dotyczące metod:

- Rozdz. 5.10: Dlaczego Doktorantka stosowała metodę oznaczania stężenia białek przez analizę porównawczą intensywności prążków izolowanych białek ze standardem BSA? To musiało być bardzo pracochłonne, szczególnie w sytuacji tak wielu białek i być może więcej niż jednokrotnej procedury izolacji. Dlaczego Doktorantka nie stosowała metod pomiarów w roztworach? Przy okazji zauważę, że na Ryc. 14 błędnie opisano stężenia standardu BSA (jest: 500, 100, 1500, 2000 ng, powinno (chyba) być: 500, 1000, 1500, 2000 ng).
- Rozdz. 5.21: Czy Doktorantka uważa, że zastosowanie kanału „pustego” na matrycy sensora Biacore Series S Chip SA w analizie SPR jest optymalną kontrolą eksperymentu? Jakie przesłanki skłoniły do wyboru kanału niepołączanego w stosunku np. do opłaszczenia kanału nieswoistym DNA?
- Rozdz. 5.20 i 5.21: Czy zastosowanie ATP w roztworach EMSA było konieczne, skoro inicjatory plazmidowe nie zawierają motywu AAA+?
- Rozdz. 5.20 i 5.21: co Doktorantka rozumie przez „zatrzymanie reakcji” w analizie EMSA i w jaki sposób fikol „zatrzymuje reakcję” (str. 70) i?
- Rozdz. 5.17: Czy w opisie metody uwzględniono wszystkie kroki? (brakuje mi wskazania etapów wymiany buforów pomiędzy kolejnymi etapami procesowania próbek).
- Rozdz. 5.22.3: Dlaczego stosowano różne polimerazy do wydłużania startera w KMnO₄ footprinting (Tab. 4, str. 73). Czy wynikało to z przesłanek technicznych (np. na danej matrycy uzyskiwano zadawalający wynik wykorzystując tylko tę konkretną polimerazę?)
- Rozdz. 5.24: Czy tak długie (przez całą noc) odbarwianie żelu barwionego EtBr nie osłabiało odczytu sygnału?

Podsumowując recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Oliwy stwierdzam, że Doktorantka wykonała badania naukowe osiągając cel pracy doktorskiej zgodnie z tytułem rozprawy doktorskiej. Moje uwagi czy pytania nie umniejszają wartości pracy ani osiągnięć Doktorantki. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Oliwy spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20.07.2018 r. i Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Oliwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii ITD PAN