



UNIwersytet
Warszawski

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



Warszawa, 30.03.2024

Opinia na temat osiągnięć naukowych ujętych w cyklu opublikowanych prac pt. „Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA” oraz ogólnej aktywności naukowej dr Katarzyny Węgrzyn, zatrudnionej na stanowisku adiunkta na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego, w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Podstawą do przygotowania opinii była dostarczona mi dokumentacja, zawierająca wymagane załączniki, w tym autoreferat Habilitantki, wykaz jej osiągnięć naukowych, artykuły stanowiące wskazane osiągnięcia naukowe oraz oświadczenia współautorów opublikowanych prac. Postępowanie jest prowadzone na podstawie zapisu Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.07.2018 roku, w szczególności na podstawie zapisu art. 219, który stanowi, że stopień doktora habilitowanego nadaje się osobie, która: (1) posiada stopień doktora, (2) posiada w dorobku osiągnięcia naukowe albo artystyczne, stanowiące znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny, oraz (3) wykazuje się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Sylwetka Kandydatki

Pani Katarzyna Węgrzyn jest absolwentką Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny). W tej jednostce uzyskała tytuł magistra biotechnologii (2005), a następnie stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii (2009). Zarówno projekt magisterski, jak i doktorski, realizowała w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej, pod opieką promotorską prof. dr. hab. Igora Koniecznego. Po uzyskaniu stopnia doktora została zatrudniona w macierzystej jednostce (obecnie Zakład Biologii Molekularnej), początkowo jako asystent (do 2012), a następnie adiunkt. Dr Katarzyna Węgrzyn odbyła trzy krótkoterminowe staże zagraniczne w Narodowym Centrum Biotechnologii w Madrycie (2011, 2012), które pozwoliły Jej na rozwinięcie warsztatu badawczego oraz uzyskanie danych eksperymentalnych istotnych dla sfinalizowania jednej z opublikowanych prac, stanowiących ważną część wskazanego we wniosku osiągnięcia naukowego. Kandydatka wykazała się zatem udokumentowaną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej, spełniła tym samym jeden z wymogów sprecyzowanych w ww. Ustawie.

Osiągnięcia habilitacyjne – ogólna charakterystyka

Dr Katarzyna Węgrzyn przedstawiła we Wniosku cykl 10 powiązanych tematycznie prac opublikowanych w latach 2012-2023, pod wspólnym tytułem – *Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA*. Jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, Kandydatka wskazała trzy osiągnięcia naukowe ujęte we wspomnianych artykułach. Osiągnięcia te dotyczyły: **(1)** opisu struktury białek Rep plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy oraz określenia działania tych białek w komórkach *Caulobacter crescentus* (2 prace oryginalne), **(2)** odkrycia oddziaływania białek Rep i ApOrc1 z jednoniciowym DNA rejonu DUE origin oraz opisu struktury kompleksów nukleoproteinowych białka RepE (3 prace oryginalne i 3 przeglądowe), a także **(3)** określenia wpływu oddziaływań z DNA w procesie proteolizy białek Rep (1 praca oryginalna i 1 przeglądowa).

Cykl przedstawionych artykułów obejmuje zatem łącznie 7 oryginalnych prac badawczych oraz 3 o charakterze przeglądowym, o sumarycznej wartości współczynnika oddziaływania czasopism (IF) 68,666. Należy zaznaczyć, że większość tych prac ukazała się w periodykach cieszących się dużą renomą w środowisku naukowym, m.in. w *Nucleic Acid Research* (IF 9,112 – 19,16, w zależności od roku publikacji) (3 prace oryginalne) czy *FEMS Microbiology Reviews* (IF 13,231) (praca przeglądowa).

Kandydatka odegrała istotną bądź kluczową rolę w powstaniu tych prac, o czym można wnioskować na podstawie: (a) jej wyróżnionej pozycji wśród współautorów (we wszystkich pracach oryginalnych jest pierwszym autorem, w tym w dwóch równorzędnym pierwszym; w trzech pełni również rolę autora bądź współautora korespondującego), (b) zapewnieniu finansowania części badań ze środków kierowanych przez nią projektów badawczych (SONATA, MINIATURA), (c) przeprowadzenia kluczowych eksperymentów podczas odbytych staży/wizyt naukowych (2 prace), oraz (d) sprecyzowanej w Załączniku nr 4 Wniosku aktywności związanej z powstaniem i opublikowaniem poszczególnych prac, polegającej m.in. na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu doświadczeń, wykonaniu części eksperymentów, analizie danych oraz udziale przy przygotowaniu manuskryptów. Znajduje to również odzwierciedlenie w stosownych oświadczeniach pozostałych współautorów oraz w opublikowanych (w niektórych pracach) deklaracjach zawartych w sekcji *Authors contribution*.

Uważam, że przytoczone wyżej argumenty w pełni uprawniają Kandydatkę do wskazania tych prac jako autorskiego osiągnięcia naukowego.

Osiągnięcia habilitacyjne – ocena wartości naukowej

Cykl przedstawionych prac (*Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA*), jak wskazuje sam tytuł, dotyczy jednego z podstawowych procesów biologicznych, jakim jest powielanie informacji genetycznej. Mimo znacznych postępów w badaniach, proces ten nie został dotąd w wystarczającym stopniu poznany. Jednym z kluczowych etapów replikacji DNA jest zainicjowanie nowej rundy replikacyjnej. Etap ten jest złożony i podlega precyzyjnej regulacji, która determinuje charakterystyczną dla danego replikonu liczbę kopii w komórce bakteryjnego

gospodarza. Kluczową rolę w inicjacji replikacji i regulacji tego procesu odrywają białka Rep, które wchodzi w specyficzne interakcje z DNA. Poznanie struktury i właściwości tych białek oraz ich oddziaływań z DNA w pobliżu i obrębie *origin* jest niezbędne dla zrozumienia mechanizmów funkcjonowania każdego replikonu.

Ad. (1). Opis struktury białek Rep plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy oraz określenia działania tych białek w komórkach *Caulobacter crescentus*

1.1. Węgrzyn et al. 2021. Defining a novel domain that provides an essential contribution to site-specific interaction of Rep protein with DNA. *Nucleic Acids Res.* 49:3394-3408.

1.2. Węgrzyn et al. 2013. RK2 plasmid dynamics in *Caulobacter crescentus* cells--two modes of DNA replication initiation. *Microbiology (Reading)*, 159:1010-1022.

Pierwsze ze wskazanych we wniosku osiągnięć dotyczy analiz systemu replikacyjnego plazmidu RK2, charakteryzującego się szerokim zakresem gospodarzy. Jest to jeden z pierwszych i najlepiej poznanych modelowych replikonów, którego analiza przyniosła wiele wartościowych wskazówek na temat molekularnych podstaw funkcjonowania oraz biologii plazmidów bakteryjnych. Jeden z wątków badawczych rozwijanych przez Kandydatkę dotyczył analiz białka TrfA, inicjującego replikację RK2. W wyniku dogłębnej analizy struktury tego białka, popartej licznymi danymi eksperymentalnymi, wykazano, że, oprócz poznanych wcześniej domen WH1 i WH2, zawiera ono (w *N*-końcowej części) dodatkową, nieopisaną wcześniej domenę (DBD). Co więcej, zademonstrowano, że wyróżniona domena (podobnie jak WH1 i WH2) warunkuje specyficzność interakcji TrfA z DNA w obrębie *origin*. Analizy porównawcze *in silico* pozwoliły na identyfikację nowej, licznej rodziny białek pokrewnych TrfA (TrfA-like), zawierających w swojej strukturze domenę DBD (1.1.).

Plazmid RK2, jako replikon zdolny do funkcjonowania w wielu odległych filogenetycznie mikroorganizmach, stanowi także dogodny model do badania mechanizmów adaptacyjnych, wpływających na efektywność relacji plazmid-gospodarz. Analizy molekularne RK2 prowadzono wcześniej jedynie w modelowych bakteriach z klasy *Gammaproteobacteria*. W pracy 1.2. postawiono za cel zbadanie podstaw funkcjonowania i utrzymywania plazmidu w komórkach innego gospodarza – *Caulobacter crescentus* (*Alphaproteobacteria*), bakterii szczególnie interesującej za względu na jej dimorficzny cykl życiowy, związany z asymetrycznym podziałem komórki. Analizowano szczegółowo lokalizację plazmidu i dynamikę rozdziału jego kopii podczas podziału komórki bakteryjnej, a także liczbę kopii plazmidu, poziom jego syntezy i tworzenie kompleksów nukleoproteinowych w obrębie *origin* RK2 w kolejnych fazach cyklu komórkowego *C. crescentus*. Badania te przyniosły wiele ciekawych i unikatowych obserwacji, z których najważniejsze, w mojej opinii, dotyczą: asymetrycznego rozkładu plazmidów w komórkach bakterii, powiązania procesu inicjacji replikacji plazmidu z określonym etapem cyklu komórkowego gospodarza, oraz możliwości zaangażowania dwóch ścieżek inicjacji replikacji plazmidu – zależnej i niezależnej od białka DnaA *C. crescentus*.

Ad. (2). Odkrycie oddziaływania białek Rep i ApOrc1 z jednoniciowym DNA rejonu DUE origin oraz opis struktury kompleksów nukleoproteinowych białka RepE

- 2.1. Wegrzyn et al., 2014. Sequence-specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin. *Nucleic Acids Res.* 42:7807-18.
- 2.2. Wegrzyn et al. 2023. Rep protein accommodates together dsDNA and ssDNA which enables a loop-back mechanism to plasmid DNA replication initiation. *Nucleic Acids Res.* 51:10551-10567.
- 2.3. Wegrzyn & Konieczny. 2021. Archaeal Orc1 protein interacts with T-rich single-stranded DNA. *BMC Res Notes.* 14:275.
- 2.4. Rajewska, Wegrzyn, Konieczny. 2012. AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev.* 36:408-34.
- 2.5. Zabrocka, Wegrzyn, Konieczny. 2014. Two replication initiators - one mechanism for replication origin opening? *Plasmid* 76:72-8.
- 2.6. Wegrzyn et al. 2016. Replisome assembly at bacterial chromosomes and iteron plasmids. *Front Mol Biosci.* 3:39.

Inspiracją do rozpoczęcia badań, których wyniki wskazano jako drugie osiągnięcie naukowe, były doniesienia świadczące o zdolności oddziaływania białka DnaA, inicjującego replikację chromosomu, z jednoniciowym DNA (ssDNA) w regionie DUE (ang. *DNA unwinding element*) chromosomowego origin. W pracach powstałych z udziałem Kandydatki podjęto się weryfikacji hipotezy zakładającej, że do analogicznych interakcji dochodzi również w przypadku innych, niespokrewnionych filogenetycznie białek inicjatorowych i ich *origin*. Badania te przeprowadzono na modelu białek inicjatorowych dwóch bakteryjnych plazmidów – RK2 (TrfA) i F (RepE) (**2.1. i 2.2.**) oraz chromosomu archeonu (nie archeobakterii, jak napisano w Autoreferacie) *Aeropyrum pernix* (białko ApOrc1; **2.3.**)

W pracy **2.1.** zademonstrowano, że białka inicjatorowe ww. plazmidów mogą tworzyć kompleksy nukleoproteinowe w obrębie DUE macierzystych replikonów, specyficznie z jedną z dwóch pojedynczych nici DNA, a także dowiedziono istotności wszystkich powtórzonych sekwencji regionu DUE plazmidu RK2 w powstawaniu stabilnych kompleksów oraz zapewnieniu aktywności replikacyjnej plazmidu. Zebrane dane pozwoliły na stworzenie alternatywnych modeli ilustrujących możliwe sposoby formowania kompleksów nukleoproteinowych w obrębie *origin*, których analiza wyznacza kierunki przyszłych badań. Z kolei zademonstrowanie oddziaływań białka ApOrc1 z ssDNA origin archeonu (**2.3.**) dowiodło, że analizowane interakcje białek inicjatorowych nie ograniczają się jedynie do układów bakteryjnych – mają więc znacznie szerszy, ogólnobiologiczny wymiar.

W trakcie badań zaobserwowano, że białka inicjatorowe plazmidów RK2 i F tworzą kompleksy zarówno z dsDNA zawierającym iterony, jak i z ssDNA regionu DUE. Wątek ten rozwinięto w kolejnej pracy (nr **2.2.**), której dużą wartością było rozwiązanie struktur krystalograficznych RepE plazmidu F – w kompleksie z ssDNA DUE oraz z ssDNA i dsDNA zawierającym iterony. Analiza tych struktur pozwoliła na wytypowanie, a następnie zdefiniowanie reszt aminokwasowych warunkujących oddziaływanie RepE z ssDNA. W toku dalszych badań jednoznacznie potwierdzono, że wiązanie białka z dsDNA i ssDNA jest niezależne, oraz dostarczono dowodów (eksperymentalnych i strukturalnych) popierających poprawność modelu *odwróconej pętli*, który zakłada zaangażowanie pojedynczej cząsteczki białka inicjatorowego w jednoczesnym wiązaniu dsDNA i ssDNA w regionie *origin*.

Do omawianego osiągnięcia naukowego Kandydatka włączyła również trzy prace przeglądowe (**2.4.–2.6.**), które ściśle dotyczą omawianej wyżej tematyki. Pierwsza z tych prac, opublikowana w czasopiśmie *FEMS Microbiology Reviews*, jest bardzo dobrym, obszernym opracowaniem, które można uznać za lekturę obowiązkową dla wszystkich badaczy zainteresowanych zagadnieniami związanymi z powielaniem informacji genetycznej i strukturą systemów replikacyjnych. W dwóch pozostałych artykułach (**2.5. i 2.6.**) podsumowano również wyniki własnych prac eksperymentalnych

(1.2. i 2.1.), co podkreśliło ich znaczenie i wkład, jaki wniosły do ogólnej wiedzy z zakresu poruszanej tematyki. Opublikowanie tych prac niewątpliwie ugruntowało pozycję Kandydatki w środowisku naukowym, jako eksperta w dziedzinie replikacji DNA.

Ad. (3). Określenie wpływu oddziaływań z DNA w procesie proteolizy białek Rep.

3.1. Karłowicz, Węgrzyn et al., 2017. Defining the crucial domain and amino acid residues in bacterial Lon protease for DNA binding and processing of DNA-interacting substrates. *J Biol Chem.* 292:7507-7518.

3.2. Karłowicz, Węgrzyn et al. 2016. Proteolysis in plasmid DNA stable maintenance in bacterial cells. *Plasmid* 86:7-13.

Trzecie wskazane we Wniosku osiągnięcie prezentuje odmienne spojrzenie na proces regulacji procesu inicjacji replikacji DNA, przez pryzmat funkcji bakteryjnych proteaz i ich wpływu na stabilność kompleksów nukleoproteinowych. W pracy eksperymentalnej (3.1.) badaniom poddano proteazę Lon *E. coli* – białko o udokumentowanej zdolności do wiązania z DNA i degradacji białka TrfA RK2. Poprzez analizę zmutowanych form proteazy wykazano, że kluczową rolę w aktywności tego białka pełni domena ATPazy. Wprowadzenie w jej obrębie mutacji skutkowało m.in. zahamowaniem zarówno wiązania białka z DNA, jak i degradacji białek inicjatorowych w kompleksach nukleoproteinowych. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosku, że wiązanie Lon z DNA odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów, których przebieg wymaga utworzenia kompleksów nukleoproteinowych.

Załączona praca przeglądowa (3.2.) zwraca uwagę na aspekty proteolizy istotne z punktu widzenia biologii plazmidów i ich stabilnego utrzymywania w komórkach bakterii. W mojej opinii jest to wartościowe opracowanie, podkreślające złożoność procesów związanych z proteolizą. Jest to istotny mechanizm regulacyjny, który jest pomijany w rozważaniach wielu badaczy. Zwrócenie na niego uwagi oraz zebranie i podsumowanie wiedzy z tego zakresu uważam za w pełni zasadne.

Podsumowując, wysoko oceniam przedstawione we Wniosku osiągnięcia naukowe dr Katarzyny Węgrzyn. Kandydatka przeprowadziła nowatorskie badania, które przyniosły wiele nowych i ważnych informacji dotyczących różnych aspektów replikacji DNA, a jednocześnie uwydatniły złożoność mechanizmów związanych z powieleniem informacji genetycznej i regulacji tego procesu. Uzyskanie tych danych było możliwe dzięki stworzeniu precyzyjnej koncepcji badań, nawiązaniu współpracy naukowej, a także przeprowadzeniu ciągu złożonych eksperymentów, wymagających zaangażowania licznych zaawansowanych technik molekularnych z zakresu biochemii, genetyki, spektrometrii, bioinformatyki, krystalografii czy mikroskopii. Uważam, że osiągnięcia te wnoszą istotny wkład do rozwoju uprawianej przez Kandydatkę dyscypliny naukowej, zatem mogą stanowić podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Ocena pozostałej aktywności naukowej

Główny kierunek badań prowadzonych przez dr Katarzynę Węgrzyn (zainicjowany już podczas studiów magisterskich) oscyluje wokół molekularnych podstaw funkcjonowania mechanizmów zapewniających stabilne utrzymywanie plazmidów w komórkach bakterii. Przeprowadzenie tych

badan było możliwe dzięki zaangażowaniu w realizację kilku nośnych projektów, w tym autorskiego projektu (SONATA), który pozwolił na określenie struktury i funkcji kompleksów nukleoproteinowych białek inicjatorowych plazmidów w regionie DUE. Znaczna część prac z tej tematyki weszła w skład wskazanych we Wniosku osiągnięć habilitacyjnych, jednak w pozostałym dorobku Kandydatki znajdują się również wartościowe prace z tego zakresu, dotyczące m.in. analizy wpływu proteolizy na funkcjonowanie mechanizmów regulujących proces inicjacji replikacji czy na aktywność systemu toksyna-antytoksyna plazmidu RK2. W swoich planach badawczych, przedstawionych w Autoreferacie, Kandydatka zakłada kontynuację badań nad procesem replikacji DNA, a za nadrzędny cel stawia poznanie pełnej struktury kompleksu nukleoproteinowego formowanego w *origin*, co jest ambitnym i ważnym naukowo wyzwaniem.

W ostatnich latach dr Węgrzyn, dzięki nawiązaniu współpracy z innymi grupami badawczymi z kraju i zagranicy, znacznie rozszerzyła swoje zainteresowania naukowe. Uczestniczyła w badaniach nakierowanych na poszukiwanie nowych biomolekuł o potencjale terapeutycznym, zdolnych do modulacji funkcji układu odpornościowego bądź wykazujących właściwości użyteczne w terapiach antynowotworowych i przeciwwirusowych. Wymiernym efektem tych działań było współautorstwo zgłoszenia patentowego oraz kilku opublikowanych prac eksperymentalnych.

Całkowity dorobek naukowy Kandydatki obejmuje współautorstwo 25 prac naukowych (z których 1 ukazała się przed uzyskaniem stopnia doktora), rozdziału w monografii wydanej przez *ASM Press* oraz doniesień na wielu konferencjach naukowych (6 prezentacji ustnych). Podana we Wniosku łączna wartość współczynnika IF czasopism, w których opublikowano ww. prace, wynosi 148,31, indeks Hirscha ma wartość 11, a całkowita liczba cytacji wynosi 317. Są to zadowalające wartości naukometryczne, świadczące również o zainteresowaniu innych badaczy wynikami opublikowanych badań.

Podsumowując, pozytywnie oceniam aktywność naukową dr Katarzyny Węgrzyn w okresie po uzyskaniu stopnia doktora. W tym czasie Kandydatka prowadziła badania o zróżnicowanej tematyce, we współpracy z różnymi grupami badawczymi z kraju i zagranicy (czemu sprzyjały także wizyty studyjne i staże naukowe), ponadto cyklicznie publikuje wartościowe prace (oryginalne i przeglądowe), ma również doświadczenie w zdobywaniu środków na badania w ogólnopolskich konkursach projektów badawczych (NCN). Uważam, że spełnia Ona pod tym względem wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego.

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z dostarczoną mi dokumentacją oraz wnikliwej analizie przedstawionych osiągnięć naukowych, całkowitego dorobku naukowego oraz aktywności naukowej dr Katarzyny Węgrzyn stwierdzam, że, w mojej opinii, Kandydatka jest dojrzałym badaczem, potrafiącym dostrzec i odpowiednio sformułować ważne problemy badawcze, zaproponować koncepcje badań, przeprowadzić te badania z wykorzystaniem odpowiedniej metodyki, wyciągnąć uprawnione wnioski na podstawie zgromadzonych danych, oraz wprowadzić uzyskane wyniki do międzynarodowego obiegu literatury naukowej. Kandydatka ma również udokumentowane we

Wniosku znaczne doświadczenie i osiągnięcia w działalności dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej, czego również oczekuje się od kandydatów do stopnia doktora habilitowanego.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość przedstawionych osiągnięć naukowych, ich wpływ na rozwój dyscypliny naukowej, a także całokształt dorobku naukowego dr K. Węgrzyn, uważam, że w pełni spełniają one kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, określone w art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie dr Katarzynie Węgrzyn stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Bartosiak', is positioned on the right side of the page.