

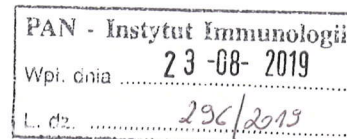


16. 08. 2019 r.

Dr hab. Anna Brzostek

Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*

Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź



Ocena pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej pt. „Rola domen I i III białka DnaA w tworzeniu kompleksu inicjującego replikację chromosomu *Helicobacter pylori*”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Anny Pawlik.

Zespół badawczy, kierowany przez Panią Promotor, dr hab. Annę Pawlik, w którym Doktorantka realizowała swój projekt, jest autorem szeregu bardzo dobrze opublikowanych prac w dziedzinie replikacji materiału genetycznego bakterii, z uwzględnieniem *Helicobacter pylori*.

Celem badań Doktorantki była charakterystyka dotąd nieopisanych w literaturze naukowej domeny I i III białka DnaA *H. pylori*. Cel ten realizowano poprzez zaproponowanie szeregu badań, które zmierzały min. do określenia roli oligomeryzacji białka DnaA w oddziaływaniu z DNA, wykazania roli homooligomeryzacji domeny I w powstawaniu kompleksu inicjującego, pokazania udziału oddziałujących białek HopA-DnaA w tworzeniu orisomu i rozplataniu regionu DUE (DNA unwinding element), a także charakterystyka białek zmutowanych w resztach aminokwasowych ważnych dla aktywności białka związanej z oddziaływaniem z ATP/ADP.

Układ tekstu rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej jest tradycyjny. Na początku Autorka zamieszcza streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, które w zwięzły sposób zapoznają czytelnika z tematyką prowadzonych badań. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze napisanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący inicjacji replikacji chromosomu. Doktorantka zwraca uwagę na uniwersalność procesu replikacji i jednocześnie opisuje jego różnice we wszystkich domenach życia. Kolejne rozdziały Wstępu dedykowane są inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego i białku inicjatorowemu DnaA, na przykładzie modelowego organizmu *E. coli*. Następnie Doktorantka zapoznaje czytelnika ze swoim modelem badawczym charakteryzując bakterie *H. pylori* i przedstawia dane literaturowe na



temat procesu inicjacji replikacji u tego gatunku. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również przemyślany i związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi autorki. Na str. 13 Doktorantka napisała **”Liczba powtórzeń DnaA-trio różni się pomiędzy gatunkami:** i wymienia gatunki podając liczbę przed którą jest skrót ok 8, ok 5 itd. Proszę wyjaśnić dlaczego używa Pani „około” podając konkretne liczby powtórzeń? Następnie opisując bakteryjne białko DnaA zwraca Pani uwagę na bakterie endosymbiotyczne, u których nie zidentyfikowano tego białka. **Czy wiadomo w jaki sposób ulega powieleniu materiał genetyczny u tych bakterii?**

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Większość procedur została dokładnie opisana umożliwiając ich odtworzenie w innym laboratorium. Zamieszczone w tab. 4. sformułowanie „oligonukleotydy stosowane do stworzenia fragmentu...” nie jest właściwe, jak również „wzrost bakterii zachodził w wytrząsarce”. Ponadto opis podłoży mikrobiologicznych nie jest precyzyjny, warto podać odnośnik literaturowy. Podobnie do podstawowych metod takich jak np. transformacja *E. coli* warto zacytować literaturę bez szczegółowego opisu. W tej części pracy zastosowano sporo żargonu laboratoryjnego np. glicerolka, obciążnik, kolonijny PCR, bufor unwindingowy itp.

Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie w pracy mikroskopii elektronowej do obrazowania kompleksów nukleoproteinowych, analizy oddziaływań białko-DNA z użyciem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) oraz wielu technik biologii molekularnej, co pozwala przypuszczać, że Doktorantka w czasie realizacji pracy zdobyła szerokie doświadczenie nie tylko w metodach obrazowania, ale również w pracy laboratoryjnej z kwasami nukleinowymi oraz białkami. W tym miejscu chcę zapytać Panią o analizy mikroskopowe wykonywane w Instytucie Max’a Plancka. Czy te analizy wykonywała Pani osobiście?

Na uwagę zasługuje ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w przygotowanie dużej liczby plazmidów oraz szczepów *H. pylori* noszących natywny gen *dnaA* lub jego modyfikacje w celu nadprodukcji różnych wariantów białka DnaA. Moim zdaniem w opisie dotyczącym konstrukcji plazmidów str. 58 poza tekstem i odnośnikami do tabel zamieszczonymi w Materiałach i Metodach watro graficznie zobrazować etapy klonowania ponieważ taki opis konstrukcji jest trudny do śledzenia. **Dlaczego dla potwierdzenia konstruktów pET21b(+)-Strep3 do syntezy białka DnaA zmutowanego w obrębie domeny III wykonano reakcję PCR i trawienie restrykcyjne (rys.14) zamiast analizy sekwencyjnej, która jednoznacznie pozwoliłaby stwierdzić obecność wprowadzonej mutacji? Ponadto zastosowany marker wielkości (1kb) nie nadaje się do**



określania małych fragmentów DNA uzyskiwanych w prezentowanych analizach restrykcyjnych.

Kolejne konstrukty wektorów serii pILL wykonała Doktorantka w celu otrzymania zmutowanych wariantów białka DnaA w domenie III co miało na celu przeprowadzenie analiz *in vivo* dotyczących wpływu ATP na proces replikacji chromosomu *H. pylori*. Podobnie w tym przypadku graficzne przedstawienie etapów klonowania wektorów serii pILL ułatwiłoby znacząco zrozumienie zawartego w pracy opisu (str. 62). **Dlaczego w prezentowanej na Rys.15 B analizie restrykcyjnej tym razem wykorzystano jako wzorzec wielkości DNA faga λ /PstI i w jakich warunkach przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne?**

Kolejny rozdział Wyników dotyczy izolacji rekombinowanych wariantów białka DnaA *H. pylori* w układzie heterologicznym *E. coli* z wykorzystaniem wektora ekspresyjnego pET21. Na uznanie zasługuje otrzymanie przez Doktorantkę 7 preparatów białkowych o wysokiej czystości z 8 zaplanowanych. W tej części zabrakło wyjaśnienia w jakim celu zostały przygotowywane białka? Ponadto warto zamieścić przykładowy żel SDS-PAGE z oczyszczania pojedynczego białka. **Proszę Doktorantkę o wskazanie prawdopodobnych powodów, które uniemożliwiły nadprodukcję białka HpDnaAK1781strep?**

W kolejnym rozdziale Pani mgr Małgorzata Nowaczyk-Cieszewska opisuje rolę domeny I i II białka DnaA w oligomeryzacji DnaA i oddziaływaniu DnaA z DNA, wykorzystując technikę utrwalania glutaraldehydem kompleksów białkowych, analizę SPR, EMSA oraz mikroskopię elektronową. Doktorantka napisała, że mikroskopia elektronowa jest jedną z metod umożliwiającą obserwacje oddziaływań pomiędzy białkiem DnaA i plazmidowym DNA zwracając uwagę na fakt, że to właśnie domena IV białka DnaA odpowiada za takie oddziaływania. Jednocześnie nie udało się zaobserwować kompleksów nukleoproteiny w przypadku wariantu białka DnaA wyłącznie z domeną IV co Autorka tłumaczy zbyt małą wielkością kompleksów. **Czy mogła by Pani zaproponować inne metody do identyfikacji małych kompleksów białko-DNA? Jakie są graniczne wielkości kompleksów dla mikroskopii elektronowej?**

Z literatury wiadomo, że białko DnaA *H. pylori* nie wymaga udziału dodatkowych białek do rozplatania helisy DNA stąd celowym było wykazanie udziału poszczególnych domen w tym procesie. W zaproponowanym teście wykorzystano zmodyfikowane białka DnaA i plazmidowy DNA por1ori2. **Proszę powiedzieć dlaczego użyła Pani 200nM białka? Czy uważa Pani, że większa ilość białka nie wpłynęłaby na wydajność procesu rozplatania plazmidu (rys.24)? Na**



jakiej podstawie uważa Pani, że domena I nie jest niezbędna do rozplatania DNA przez białko DnaA (str. 81)?

Doktorantka zaobserwowała, że inkubacja białka DnaA z białkiem HopA w wysokim stężeniu hamuje proces rozplatania helisy DNA. **Czy *in vivo* istnieją warunki, w których dochodzi do zwiększonej produkcji białko HopA?**

Opisując wpływ oddziaływania DnaA z ATP i ADP na tworzenie kompleksów DnaA-DNA z wykorzystaniem metody SPR nie zacytowano w tekście zamieszczonych w tym rozdziale tab.15 i rys.27, ry.28. Bardzo interesujące są wyniki dotyczące analizy wpływu ATP na rozplatanie DNA przez białko DnaA, które po raz pierwszy udowadniają, że białko DnaA jest aktywne wyłącznie w formie związanej z ATP, a mutacja w palcu argininowym R285A osłabia znacząco zdolność do otwierania helisy DNA.

Kolejne badania Doktorantki zmierzały do syntezy białek DnaA z mutacjami w obrębie motywu AAA⁺. Do tego celu wykorzystano szczep N6 *H. pylori* i plazmidy pILL2150 i pILL2157 umożliwiające syntezę białek odpowiednio na poziomie zbliżonym do natywnej produkcji lub zwiększonej. Z zaprezentowanych w tym rozdziale wyników trudno było się zorientować czy przeprowadzona mutageniza powiodła się czy też nie. Dopiero zamieszczony schemat wymiany natywnej kopii genu na zmutowaną zamieszczony na str. 94. ułatwia prześledzenie wcześniejszych wyników opisanych w tym rozdziale. Pomimo dużego nakładu pracy Doktorantki uzyskano tylko jeden potencjalny szczep z mutacją w regionie AAA⁺ (N6 2157DnaAR334AstrepΔ), którego genotyp potwierdzono metodą PCR z wykorzystaniem odpowiednio zaplanowanych sekwencji starterowych, przy czym warto byłoby zaznaczyć na rys.41. pozytywny wynik. **Czy z powodu trudności w wyselekcjonowaniu właściwych szczepów nie obawia się Pani, że uzyskany szczep mutant jest prawidłowy? Czy nie należało wykorzystać dodatkową metodę dla potwierdzenia genotypu mutantu?** W podsumowaniu prób uzyskania mutantów wspomina Pani, że w szczepach z mutacją R285A, „zmutowana wersja genu *dnaA* kodowana na plazmidzie została naprawiona”. **Prosiłabym Panią o wyjaśnienie jakie mechanizmy naprawy DNA zostały prawdopodobnie uruchomione? Czy ta mutacja może być letalna dla komórek *H. pylori*?**

W kolejnym punkcie dotyczącym mutacji K178I opis wydaje się być odmienny od obserwowanych wzorów restrykcyjnych dla restryktazy Sau3A. Czy mogłaby Pani wyjaśnić te rozbieżności? Moim zdaniem, ten rozdział Wyników nie powinien być tak rozbudowany z uwagi na większość negatywnych wyników związanych z selekcją szczepów o pożądanym właściwościach.



W ostatnim etapie badań Doktorantka sprawdzała wzrost szczepu N6 *H. pylori*, noszącego dodatkowo zmutowane w obrębie motywu AAA+ kopie genu *dnaA*, na podłożu stałym z lub bez dodatku induktora (IPTG). Na podstawie zamieszczonego rys. 42 trudno jest, moim zdaniem, ocenić różnice we wzroście badanych szczepów. **Wydaje się, że obecność samego plazmidu pILL2157 wpływa na osłabienie wzrostu *H. pylori* po indukcji IPTG, czy zatem można mówić o efekcie letalności szczepów związanej z nadprodukcją DnaA lub jego zmutowanych form? Czy analizy CFU nie byłyby bardziej informatywne?**

Należy nadmienić, że Doktorantka starannie zilustrowała przeprowadzone badania i włożyła mnóstwo pracy w przygotowanie i analizy szczepów- mutantów.

Dyskusja pracy została podzielona na podrozdziały i zawiera przemyślane interpretacje uzyskanych wyników świadczące o znajomości badanej tematyki, umiejętności wyciągania logicznych wniosków w oparciu o własne spostrzeżenia, jak również dane literaturowe (128 pozycji literatury). Jednak niektóre fragmenty dyskusji powinny zostać pominięte z uwagi na powtórzenia danych już wcześniej zamieszczonych w części wynikowej pracy, zaś Tab.19. powinna znaleźć się w odpowiedniej części wynikowej, co ułatwiłoby interpretacją otrzymanych wyników.

Na zakończenie Doktorantka przedstawia szczegółowe wnioski wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań własnych, które w dużej mierze mogły znaleźć się w podsumowaniu poszczególnych etapów części eksperymentalnej. Uważam, że wśród wniosków końcowych należało postawić wnioski bardziej ogólne.

W tekście rozprawy zauważono pewne błędy językowe i redakcyjne, a także zwroty żargonowe czy niepoprawne sformułowania, jak również nieliczne nieścisłości w cytowanej literaturze (np. brak czasopisma). Na stronie tytułowej pracy przypuszczam, że miał być wpisany rok 2019?

Na zakończenie chciałabym poprosić **Doktorantkę o podzielenie się podczas publicznej obrony swoimi przemyśleniami na poniższe kwestie:**

- **Co dla Pani stanowi największe osiągnięcie naukowe związane z realizacją podjętych celów pracy doktorskiej?**
- **Czy pomimo wielu podobieństw strukturalnych pomiędzy białkami DnaA z *E. coli* i *H. pylori*, faktycznie tylko HopA jest jedynym białkiem partnerskim dla DnaA u *H. pylori*?**

**Podsumowanie:**

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera bardzo wartościowe wyniki co wpływa na moją wysoką ocenę osiągnięć Pani mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej, a zawarte pytania, wątpliwości nie wpływają w najmniejszym stopniu na pozytywną ocenę pracy. Jednocześnie stwierdzam, że praca mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk biologicznych i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN o dopuszczenie mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Brzostek