



Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska@ug.edu.pl
phone: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 20.08.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej
„Rola domen I i III białka DnaA w tworzeniu kompleksu inicjującego replikację
chromosomu *Helicobacter pylori*”

Regulacja najbardziej istotnych procesów u organizmów żywych jest bardzo ważnym tematem badań naukowych. Replikacja DNA, jako niezbędny element cyklu wzrostu i podziału komórek od organizmów prokariotycznych do eukariotycznych, jest jednym z lepiej poznanych procesów, jednakże większość wiedzy pochodzi z badań z zastosowaniem organizmów modelowych, jakimi dla bakterii są przykładowo *Escherichia coli* czy *Bacillus subtilis*. Dlatego dla całości wiedzy bardzo ważne są badania istotnych procesów życiowych u innych niż modelowe organizmów. W przypadku bakterii jest to tym ważniejsze, gdy przedmiotem badań są mikroorganizmy patogenne gdzie poznanie regulacji najważniejszych procesów może być pomocne w projektowaniu skutecznych terapii. Takim organizmem jest bakteria *Helicobacter pylori*, uznawana za czynnik etiologiczny poważnych schorzeń jak wrzody i stan zapalny żołądka czy procesów prowadzących do rozwoju nowotworów żołądka. Dlatego, badania nad tym

mikroorganizmem pełnią zarówno funkcję poznawczą, dla rozwoju badań podstawowych, jak i potencjalnie aplikacyjnie. W tym są badania nad procesami niezwiązanymi bezpośrednio z regulacją wirulencji mikroorganizmu, takimi jak regulacja replikacji DNA. Szczególnie, jeśli badane procesy mogą być regulowane w sposób odmienny od tego poznanego dla bakterii modelowych. Takim właśnie tematem zajęła się Doktorantka, Pani mgr Małgorzata Nowaczyk-Cieszewska podczas prac nad rozprawą doktorską. Badania zostały wykonane w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN pod opieką Pani dr hab. Anny Pawlik. Zespół Pani Promotor od wielu lat zajmuje się tematyką regulacji replikacji i podziałów komórkowych u nietypowych bakterii (jak promieniowce), oraz *H. pylori*. Dzięki szerokiemu doświadczeniu naukowemu Promotora pracy jak i świetnemu warsztatowi badawczemu obejmującemu najnowsze techniki biochemiczne, molekularne i mikrobiologiczne, Doktorantka mogła wykonać złożoną i ciekawą pracę.

Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr. Małgorzaty Nowaczyk-Ciesielskiej było molekularne scharakteryzowanie białka DnaA bakterii *Helicobacter pylori*. Białko to jest czynnikiem inicjatorowym replikacji DNA i jest obecne w większości zbadanych do tej pory bakterii. Dotychczasowe badania wskazywały, iż działanie DnaA *H. pylori* jak również formowanie się kompleksu replikacyjnego znacząco różni się od analogicznego procesu u *E. coli*. Ponadto, określały one głównie budowę i funkcjonowanie rejonu origin *H. pylori*. Dlatego, uzasadnione jest podjęcie przez Doktorantkę problemu budowy i działania głównego białka regulującego inicjację replikacji, DnaA tej bakterii. Badania te wymagały całego zakresu metod inżynierii genetycznej (konstrukcja plazmidów i szczepów niosących mutacje), molekularnych (jak badanie oddziaływań białko-DNA) czy mikroskopowych (wizualizacja wiązania DnaA do DNA).

W rozprawie przedstawiono wiele interesujących wyników i wniosków. Spośród nich, za najważniejsze uważam:

- skonstruowanie układu do badania właściwości poszczególnych domen białka DnaA *H. pylori* – białek o różnym składzie domen oraz wersji z zamienionymi resztami aminokwasowymi w potencjalnie istotnych dla funkcji białka rejonach,
- określenie roli domen DnaA w oligomeryzacji białka,
- zbadanie oddziaływań pomiędzy DnaA a rejonem oriC i roli w tym oddziaływaniach domen I-II,

- opisanie znaczenia domeny III DnaA *H. pylori* w rozplataniu DNA,
- zbadanie roli białka HobA w inicjacji replikacji z udziałem DnaA.

Rozprawa ma typowy układ z podziałem na odpowiednie rozdziały. Streszczenie (w języku polskim i angielskim) podsumowuje osiągnięcia pracy. Obszerny Wstęp wprowadza w zagadnienia regulacji replikacji u różnych organizmów, porównując mechanizmy regulacyjne u prokariotów, eukariotów i archeonów. Szczegółowo została opisana budowa i rola białka DnaA *E. coli* jako odnośnika dla badań nad odpowiadającym mu białkiem *H. pylori*. Podane są także istotne informacje o stanie wiedzy na temat regulacji replikacji DNA u *H. pylori*. W pracy przydałby spis zastosowanych skrótów. Cel pracy został określony wraz z zaplanowanymi etapami pracy. Dokładnie opisane Materiały i Metody pozwalają zapoznać się z szerokim zakresem zastosowanych badań, a prezentowane tabele i schematy ułatwiają zrozumienie treści prezentowanych w kolejnym rozdziale. Wyniki opisane są w sposób jasny i uporządkowany, z informatywnymi tytułami podrozdziałów oraz schematami konstruktów i układów eksperymentalnych. Zwraca uwagę zastosowanie szeregu dobrze dobranych metod, jak i zakres wiedzy i doświadczenia Doktorantki. Wnioski z przeprowadzonych badań zostały poparte wynikami różnorodnych doświadczeń, w tym klasycznych typu badania kompleksów DNA-białko przez analizę opóźnienia migracji w żelu do precyzyjnych badań oddziaływań metodą rezonansu plazmonowego. Zastosowano także obrazowanie kompleksów DnaA-DNA przy użyciu mikroskopii elektronowej, we współpracy z Max Planck Institute w Berlinie. Podkreślić należy umiejętności Doktorantki w zakresie konstrukcji plazmidów i szczepów, a przede wszystkim oczyszczania białek. W rozprawie, starannie przedstawione zostały ryciny, aczkolwiek zabrakło wyraźniejszych fotografii z analiz mikroskopowych. Szkoda, że rozdział Dyskusja nieco odbiega od wysokiego poziomu prezentowanych rezultatów pracy – stanowi on w sporej części rekapitulację uzyskanych wyników zamiast przedyskutowania najważniejszych informacji w kontekście obecnego stanu wiedzy. Byłoby to bardzo istotne szczególnie, iż *H. pylori* reprezentuje bakterie, w których mechanizmy działania białka DnaA są częściowo odmienne od tych znanych dla bakterii modelowych. Bibliografia cytuje stosownie dobrany wybór aktualnych prac w tematyce regulacji replikacji DNA. Zwraca uwagę niejednorodny zapis pozycji literaturowych (np. w niektórych podane są pełne imiona, a w innych inicjały autorów). Załączniki podają informacje uzupełniające te już zaprezentowane w rozprawie.

Praca napisana jest przejrzysto i jasno, jednakże zwraca uwagę kilka powtarzających się błędnych wyrażen – takich jak „zmutowane białko”, „warianty białka zmutowane w resztach aminokwasów”. Są to wyrażenia skrótowe i żargonowe, a zarazem niepoprawne – mutacje mogą pojawiać się jedynie w genach. Niepotrzebnie również zastosowane zostało określenie „boksy” zamiast odpowiadającemu mu „kaseta”. Jednakże, w przeważającej części, praca napisana jest ładnym językiem, z dbałością o gramatykę i interpunkcję.

Chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź na uwagi i pytania dotyczących rozprawy i przedstawionych w niej wyników:

1. Czy, biorąc pod uwagę zakres podobieństwa białek DnaA u *E. coli* i *H. pylori*, można – i warto – byłoby zbadać możliwość zastępowania się tych białek w swoich funkcjach?
2. Podczas oczyszczania białka DnaA *H. pylori* zostały zastosowane wysokie stężenia glutaminianu potasu, w celu zapobiegnięcia agregacji preparatu. Czy nadmiar glutaminianu potasu może zatem wpływać na obserwowane wyniki badań z użyciem oczyszczonych białek?
3. W analizach mikroskopowych mierzona była odległość miejsca wiązania DnaA od końca liniowego DNA. Czy fragmenty DNA były wyznakowane na określonym końcu, by uniknąć problemów z identyfikacją miejsca?
4. Chciałabym zapytać o zdanie Doktorantki na temat hipotetycznej korelacji między trybem życia i fizjologią *H. pylori*, a mechanizmem działania DnaA w inicjacji replikacji
5. Pokazane zostały różnice w aktywności białka DnaA związanego z ATP bądź ADP, także dla białek ze zmienionymi miejscami odpowiedzialnymi za wiązanie i hydrolizę ATP – na podstawie podobieństw sekwencji z DnaA *E. coli*. Czy nie bardziej celowe byłoby zbadanie aktywności DnaA jako ATPazy?
6. W doświadczeniach opisanych w rozdziale 4.5.2 wskazano na hamującą wzrost a nawet letalną nadprodukcję form białek DnaA ze zmienioną sekwencją aminokwasową. Czy można wykluczyć, że hamujący efekt nie był powodowany tylko przez nadmiar w komórce białka DnaA po indukcji, a nie przez obecność zmienionych białek?

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca wnosi istotny wkład w poznanie mechanizmów replikacji DNA w komórkach bakterii *Helicobacter pylori*. Zastosowane różnorodne molekularne metody pozwoliły na analizę funkcji domen białka inicjatorowego DnaA, poszerzając wiedzę o działaniu i budowie tego białka, stanowiąc o wartości tej pracy. Dlatego, mogę stwierdzić, iż rozprawa spełnia wymogi określone dla prac doktorskich, opisane w Ustawie z dnia 18.03.2011 o stopniach naukowych i tytułach naukowych. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Nowaczyk-Cieszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz