



mp. 19.11.2019

Wrocław, 06.11.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kozłowskiej

pt.: „Strategie regulacji formowania makromolekularnych kompleksów inicjujących proces replikacji fagów niosących geny toksyn Shiga”

Powielanie materiału genetycznego musi być ściśle skoordynowane z cyklem życiowym danego organizmu i najczęściej regulowane jest na poziomie inicjacji tego procesu. Replikacja DNA rozpoczyna się od utworzenia funkcjonalnego nukleoproteinowego kompleksu, a jego podstawowe składowe, region inicjacji replikacji (*origin*) oraz białko (białka) swoiście wiążące ten region, podlegają ścisłej kontroli. Celem recenzowanego doktoratu było poznanie mechanizmu tworzenia nukleoproteinowego kompleksu inicjującego replikację DNA lambdoidalnych fagów niosących geny toksyn Shiga. Wielkość genomu faga λ (50 kbp) jest mała i dlatego stał się on dogodnym modelem do badania procesu replikacji DNA w czasach, kiedy jeszcze nie możliwe było sekwencjonowanie dłuższych fragmentów DNA. Dzięki badaniom nad replikacją DNA faga λ potwierdzono po raz pierwszy hipotezę replikonu (Jacob i wsp., 1964), według której proces replikacji rozpoczyna się określonym miejscu (*origin*), a utworzone widełki replikacyjne podążają w przeciwnych kierunkach. Pomimo, że replikacja DNA lambdoidalnych fagów badana jest od prawie 40 lat stosunkowo niewiele wiadomo na temat architektury nukleoproteinowego kompleksu inicjującego ten proces zwłaszcza u fagów niosących geny toksyn Shiga. A zatem podjęcie badań w ramach recenzowanego doktoratu było w pełni uzasadnione. Dodatkowo należy podkreślić, że zespół kierowany prof. hab. dra Grzegorza Węgrzyna ma duży wkład w badania nad mechanizmem procesu replikacji faga λ .

Oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ przyjęty dla tego typu opracowań. We „Wstępie”, liczącym niecałe 8 stron, Doktorantka dość powierzchownie przedstawiła zagadnienia dotyczące replikacji DNA bakteriofagów λ , nie zamieszczając żadnych schematów ilustrujących przykładowo mechanizm inicjacji replikacji DNA faga λ . Przedstawiono jedynie

zestawienie sekwencji nukleotydowych fragmentów genomów zaangażowanych w inicjację replikacji DNA. We „Wstępie” Doktorantka powinna poświęcić nieco więcej miejsca białku O, które jest przedmiotem recenzowanego doktoratu, opisując między innymi jego domenową strukturę. Pozwoliłoby to lepiej zrozumieć jakie znaczenie (o ile w ogóle jakieś) mogą mieć zmiany reszt aminokwasowych w białku O fagów P27 i P933W. Wstęp powinien zawierać niezbędne informacje, dzięki którym z łatwością można śledzić dalsze rozdziały doktoratu. Ponadto, we „Wstępie” znalazłam kilka niefortunnnych sformułowań, przykładowo: „Większość szczepów *E. coli* występuje w formie komensali”, „...wirusów, które szybko replikują swoje genomy...”, czy też traktowanie fagów jako organizmów (str. 17). Ponadto, w legendzie do ryc. 1 jest błąd (kolor iteronów).

„Cel pracy” wystarczyłoby zakończyć na pierwszym zdaniu, które w sposób krótki i jasny wyjaśnia jaki mechanizm chciała zbadać Doktorantka. Zmieszczenie w „Celu pracy” cząstkowych *stricte* technicznych celów (np., zaprojektowanie matryc DNA) nie powinno mieć miejsca w doktoracie.

Rozdział „Metody” jest miejscami zbyt lakonicznie napisany i na jego podstawie trudno byłoby powtórzyć niektóre z metod, np., testy FRET. Ponadto w tabelach przedstawiających warunki różnych reakcji podano tylko objętości poszczególnych reagentów, bez podawania ich stężeń! Natomiast w wykazie stosowanych skrótów pojawił się klasyczny błąd, a mianowicie umieszczanie wzorów sumarycznych związków (CaCl_2 , NaCl , MnCl_2 , MgCl_2).

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna się dość nietypowo. W rozdziale tym nie ma bowiem żadnego wprowadzenia, a jego początek stanowi techniczny podrozdział zatytułowany „Uzyskane konstrukty plazmidowe”. W podrozdziale tym Doktorantka prezentuje na 8 stronach schematy uzyskanych plazmidów. Stanowi to swoisty wypełniacz tego podrozdziału. Tego typu informacje powinny znaleźć się w Załączniku na końcu rozprawy doktorskiej. Ponadto mapy restrykcyjne 6 plazmidów w zasadzie niczym nie różnią się między sobą (oprócz symbolu iteronu). Dalsza część „Wyników” poświęcona jest izolacji i oczyszczaniu trzech białek λO , P27 and 933W, wstępnej weryfikacji ich aktywności oraz zdolności tych białek do tworzenia

oligomerów. Ta część doktoratu została zawarta w pracy pt. „Purified Stx and λ phage initiator O proteins bind specifically to two different origins of replication *in vitro*” opublikowanej w specjalistycznym czasopiśmie *Protein Expression and Purification* (2017 Mar;131:16-26. doi: 10.1016/j.pep.2016.11.002), w której Doktorantka jest pierwszym autorem. A zatem wyniki zawarte w tej części doktoratu (dotyczy to 9 rycin) i wnioski z nich płynące zostały już ocenione przez dwóch niezależnych recenzentów, co częściowo zwalnia recenzenta pracy doktorskiej ze szczegółowej ich oceny. Niemniej jednak chciałabym podzielić się kilkoma drobnymi uwagami. Opisy rycin, które również prezentowane są w publikacji, powinny być pełniejsze. Brakuje nazwy organizmu, w którym naprodukowano białka O, w jakim żelu analizowano poszczególne etapy oczyszczania białek (ryc. 16, 17, 19), na jakiej kolumnie chromatograficznej rozdzielano białka, (ryc. 18, 20), w jakim żelu analizowano kompleksy białek O z DNA (ryc. 20) oraz jego oligomery (ryc. 22).

Zasadnicza część „Wyników” poświęcona jest szczegółowej analizie oddziaływań białek O z regionami *origin* fagów λ , poszczególnymi iteronami lub ich kombinacją. Do tej części mam najwięcej uwag i zastrzeżeń:

1. Krótkie dwuniciowe oligonukleotydy używane do testów EMSA powinny być przygotowane w inny sposób, a mianowicie jeden z oligonukleotydów powinien zostać wyznakowany izotopowo (lub nieizotopowo), a następnie poddany hybrydyzacji z komplementarnym „zimnym” oligonukleotydem, przy nadmiarze tego drugiego (co najmniej 1:5), a uzyskana w ten sposób znakowana sonda powinna być oczyszczona. Tak przygotowana sonda zapewni, że analizowane będą oddziaływania białka O z dwuniciowym DNA, a nie mieszaniną dwu- i jednoniciowych oligonukleotydów.

2. Trudno wyciągać wnioski na temat powinowactwa białek O względem analizowanych sekwencji bazując na testach EMSA prowadzonych w żelach agarozowym. Kompleksy białko O - DNA, a zwłaszcza krótkie ds oligonukleotydy, powinny być analizowane w żelach akryloamidowych.

3. Rycina 25, ścieżki źle zaznaczone, trudno zinterpretować tę rycinę.

4. W „Wynikach” nie podane są wielkości analizowanych fragmentów DNA, w tym te uzyskane za pomocą PCR, co utrudnia interpretację wyników. Nie wiadomo, jakie otoczenie mają sklonowane w pUC18 poszczególne iterony i jak je klonowano.

5. Wnioski dotyczące powinowactwa białek O do określonych fragmentów DNA/interonów powinny być poparte wynikami dodatkowych analiz, przy użyciu innych niż EMSA metod (np. powierzchniowy rezonans plazmonowy).

6. Trudno jest zinterpretować, ze względu na złą rozdzielczość zamieszczonych skanów, niektóre z testów DMS *footprinting*. Może powinna zostać przeprowadzona analiza densytometryczna.

7. Ryc. 45, reakcje sekwencjonowania nie są podpisane. Czy sprawdzono, że w analizowanych warunkach zachodzi transkrypcja?

Jednym z ostatnich podrozdziałów „Wyniki” była analiza oddziaływania białka O z jednoniciowym DNA. Ta część powinna być również szerzej opisana. Na wykresach obrazujących FRET (ryc. 42) brak jest jednostek na osi Y (intensywność fluorescencji czy jednostki umowne?). Nie są zaznaczone sygnały od donora i akceptora (Cy3 i Cy5). Ponadto w części B, C ryc. 42 intensywność sygnału różni się od intensywności sygnału w części D. Nie wiadomo również, ile białka i ssDNA wzięto do analizy FRET. W teście EMSA nie opisano, jaki żel zastosowano, jak długie były fragmenty ssDNA oraz w jaki sposób prowadzono detekcję DNA.

Doktorantka zaproponowała model struktury trzeciorzędowej N-terminalnej domeny wiążącej DNA białka O, ale i ta część nie została opisana z należyłą starannością, zwłaszcza podpisy do rycin 35, 36.

Rozdział „Dyskusja” został podzielony na 10 podrozdziałów, w których osobno omawiane są poszczególne cykle doświadczalne. Myślę, że lepiej byłoby, gdyby poszczególne tytuły podrozdziałów „Dyskusji” stanowiły wnioski płynące z wyników tych doświadczeń, a nie były technicznymi podtytułami. Doktorantka prowadzi dyskusję w sposób świadczący o dobrej znajomości tematu. Niestety wnioski zawarte w „Dyskusji” są często nieco na wyrost formułowane, przykładowo wyciąganie, na podstawie testów EMSA, wniosków dotyczących powinowactwa białek O do poszczególnych interonów czy też masy nukleoproteinowych kompleksów analizowanych w żelach agarozowych.

Reasumując za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki uważam:

1. Opracowanie procedury izolacji i oczyszczania białka O z różnych fagów, w tym fagów niosących geny toksyn Shiga.
2. Zaproponowanie modelu tworzenia kompleksów inicjujących replikację DNA u fagów λ niosących geny toksyn Shiga.

Powyższe dość liczne uwagi przyczyniają się to tego, że recenzowanej pracy doktorskiej nie oceniam wysoko. Jednakże uważam, że ze względu na zawarte w niej oryginalne wyniki, w tym częściowo opublikowane, spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proszę Doktorantkę o staranne ustosunkowanie się do uwag i pytań zawartych w recenzji.



Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska

