

Warszawa, 22.01. 2017



Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Wawrzyckiej
pt. "Mechanizm wiązania polimerazy III *Escherichia coli* z origin
plazmidu RK2" wykonanej w Pracowni Biologii Molekularnej
Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego
Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego**

Rozprawa wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Igora Koniecznego napisana w języku polskim, składa się ze Streszczenia, Wstępu, Celu pracy, opisu Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, wyszczególnionej cytowanej Literatury. Duża część wyników przedstawionych w pracy doktorskiej została opublikowana w wysoko cenionym czasopiśmie – *Proc Natl Acad Sci USA* w 2015 roku, w pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem. Pani Aleksandra Wawrzycka jest również współautorem pracy w *Microbiol Spectrum* z 2014 roku.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było poznanie mechanizmu składania kompleksu polimerazy III DNA *Escherichia coli* w miejscu startu replikacji plazmidu RK2.

Badania nad mechanizmami replikacji plazmidów prowadzone są już od kilku lat, z dużym powodzeniem, przez pracownię pod kierunkiem Profesora Igora Koniecznego. Prezentowana rozprawa przedstawia wyniki będące kontynuacją badań zespołu.

Dane literaturowe zawarte w części teoretycznej pracy doktorskiej (Wstęp) są ściśle podporządkowane zagadnieniom i celom opisanym w pracy. W rozdziale tym Doktorantka wykazała dużą i bardzo aktualną wiedzę na temat procesów inicjacji replikacji DNA w komórkach bakteryjnych.

Rozdział Materiały i Metody obrazuje bogactwo użytych technik i metod stosowanych w kolejnych etapach realizacji celów pracy doktorskiej.

Wyniki opisane są bardzo jasno, są dobrze udokumentowane i na końcu każdego rozdziału opatrzone stosownym wnioskiem. Zasadniczo nie mam zastrzeżeń do strony graficznej prezentowanych wyników, jednakże Rycina nr 3, niestety, jest nieczytelna.

Większość opisanych wyników, opublikowana w prestiżowym piśmie *Proc Natl Acad Sci USA*, poddana była bardzo wnikliwym recenzjom przygotowanym przez uznanych badaczy specjalizujących się w opisywanej dziedzinie badań, dlatego też Recenzent głównie ograniczy się do krótkiego opisu wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej.

Badanie mechanizmów powstawania kompleksu replikacyjnego jest nadzwyczaj ważne dla poznania mechanizmów inicjacji replikacji DNA. Replikacja *in vitro* plazmidowego DNA RK2 została przeprowadzona i opisana w 1997 roku przez profesora Igora Koniecznego i współpracowników. Replikacja ta zachodzi przy udziale białek komórek gospodarza tj. DnaA, HU, helikazy DnaB, DnaC, białek SSB, primazy DnaG, gyrazy i polimerazy III DNA. Natomiast DNA plazmidowe koduje gen białka inicjatorowego, w przypadku plazmidu RK2 jest to białko TrfA. Ponadto, DNA plazmidu zawiera sekwencje startu replikacji *oriV*. Wykazano że białko TrfA oddziałuje z DnaA i DnaB podczas procesu inicjacji. Co ciekawe, analiza sekwencji aminokwasowej białka TrfA pozwoliła na zidentyfikowanie motywu charakterystycznego dla białek oddziałujących z β pierścieniem polimerazy III DNA *Escherichia coli*.

Białko TrfA inicjując replikację plazmidu RK2 aktywne jest w formie monomerycznej. Struktura krystaliczna tego białka nie została do tej pory uzyskana. Pracownia Pana

Profesora Igora Koniecznego wykazała, że białko to wiąże się do dwuniciowego DNA w obrębie sekwencji iteronowej, jak również do jednoniciowej sekwencji regionu bogatego w pary AT. Sekwencje iteronów, jak i sekwencje im towarzyszące, mają istotne znaczenie dla wiązania inicjatora replikacji plazmidu RK2 i stabilności kompleksów nukleoproteinowych. Biorą udział w kontroli inicjacji replikacji i kontroli ilości kopii cząsteczek plazmidu.

Celem przedstawionej pracy było badanie oddziaływań pomiędzy białkiem inicjującym replikację plazmidu RK2, a białkami kompleksu polimerazy III DNA podczas inicjacji replikacji DNA.

W pracy skonstruowano plazmidy niosące geny kodujące różne warianty białka TrfA, posiadające mutacje w obrębie motywu QLSELF. Motyw ten występuje w wielu białkach oddziałujących z pierścieniem β . Uzyskano aktywne preparaty białek TrfA Δ LF oraz TrfAF138A. Następnie badano oddziaływania wariantów TrfA z β pierścieniem polimerazy III DNA. W tym celu oczyszczono β pierścienie i analizowano oddziaływanie białek z β pierścieniem metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Wykazano że motyw QLSELF jest ważny w tych oddziaływaniach, gdyż białko posiadające delecje aminokwasów (leucyny i fenyloalaniny) nie oddziałuje z pierścieniem β , a białko TrfA F138A wykazuje znaczące obniżenie zdolności do tworzenia kompleksu. Aby sprawdzić do jakiego stopnia zmutowane formy białka TrfA wpływają na syntezę DNA plazmidu RK2, oczyszczono białko DnaC i przeprowadzono analizę aktywności replikacyjnych wariantów TrfA *in vitro* używając ekstraktów *Escherichia coli* oraz w systemie rekonstruowanym z oczyszczonych komponentów. Zarówno w testach *in vitro* jak i teście *in vivo* wykazano obniżoną aktywność replikacyjną białka TrfA F138A w porównaniu do TrfA typu dzikiego oraz zahamowanie syntezy w obecności wariantu TrfA z delecją dwóch aminokwasów. Aby bliżej sprecyzować mechanizm zaburzeń syntezy plazmidowego DNA spowodowany zmianami w motywie QLSELF analizowano oddziaływania różnych wariantów białek TrfA z sekwencją iteronową, tworzenie kompleksu otwartego, aktywację helikazy oraz tworzenie kompleksów polimerazy III DNA. Wykazano że mutacje w motywie QLSELF nie wpływają na zdolność białka TrfA do wiązania z DNA oraz nie wpływają na tworzenie kompleksu helikazy.

Doktorantka podjęła próbę odpowiedzi na pytanie, jaką rolę spełnia oddziaływanie białka TrfA i β pierścienia w procesie replikacji DNA plazmidu RK2. Postanowiła

sprawdzić, czy obecność białka TrfA wpływa na tworzenie kompleksu nukleoproteinowego z DNA plazmidu RK2. Wykazano oddziaływania β pierścienia z TrfA związanym z DNA sekwencji iteronowej. Analiza m.in. aktywności replikacyjnej matrycy superzwiniętego DNA zawierającego *oriV* w systemie rekonstruowanym *in vitro* z oczyszczonych komponentów oraz wyniki sączenia molekularnego kompleksu replikacyjnego utworzonego na superzwiniętym matrycowym DNA zawierającym *oriV* wykazały, że do utworzenia kompleksu nukleoproteinowego β pierścienia na DNA plazmidu RK2 konieczna jest forma białka TrfA o nie zmienionej sekwencji QLSLF. Warianty białka TrfA niosące mutacje w tym motywie nie tworzyły kompleksu nukleoproteinowego β pierścienia (TrfA Δ LF) lub wykazywały znaczne zaburzenie tworzenia kompleksu (TrfAF138A). Wykazano, że oprócz białka TrfA, w tworzeniu kompleksu β pierścienia z *oriV* plazmidu RK2 niezbędne są również: kompleks gamma polimerazy III DNA, DnaA, helikaza i primaza. Używając techniki sączenia molekularnego w obecności wariantów TrfA, superzwiniętego plazmidowego DNA, niosącego *oriV* oraz ekstraktu komórkowego z bakterii *E coli* badano czy białko TrfA bierze udział w powstawaniu kompleksu nukleoproteinowego katalitycznej podjednostki alfa polimerazy III DNA w rejonie *oriV*. Wykazano że białko istotnie stymuluje powstawanie takiego kompleksu. Jednakże możliwość utworzenia kompleksu obserwowano również w mutancie z delecją LF. Wynik ten mógłby sugerować, że kompleks podjednostki alfa polimerazy III DNA w *oriV* może tworzyć się bez udziału β pierścienia. Podjęto próbę dokładniejszego poznania tego mechanizmu. Sprawdzone czy oddziaływania między TrfA, β pierścieniem i podjednostką alfa mogą być konkurencyjne względem siebie. Wykazano, że oddziaływanie pomiędzy TrfA, a podjednostką alfa nie wpływa na oddziaływanie podjednostki alfa z β pierścieniem w obecności TrfA.

Wyniki otrzymane w pracowni profesora Koniecznego sugerowały rolę białka TrfA jako czynnika determinującego kierunkowość replikacji DNA plazmidu RK2. Postanowiono zweryfikować tę hipotezę, analizując tworzenie kompleksu replikacyjnego na górnej i dolnej nici DNA zawierającego origin replikacji plazmidu RK2. Wszystkie warianty białka TrfA tworzyły kompleks z jednoniciowym fragmentem DNA zawierającym sekwencje rejonu bogatego w pary AT nici dolnej. Natomiast żaden z wariantów nie oddziaływał z jednoniciowym fragmentem DNA nici górnej.

Otrzymane wyniki są nowatorskie i wskazują na rolę białka TrfA w procesie tworzenia kompleksu replikacyjnego na nici wiodącej.

Dyskusja przedstawiona w rozprawie doktorskiej świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki. Zawiera odniesienia do najnowszych danych literaturowych. W Dyskusji przedstawiono model zakładający, że TrfA wiążąc się do 13-nukleotydowych sekwencji nici dolnej oddziałuje z helikazą, podjednostkami alfa i beta polimerazy III DNA determinując tworzenie kompleksu replikacyjnego, syntetyzującego w określonym kierunku. W Dyskusji Doktorantka szczegółowo omawia otrzymane wyniki, proponując różne hipotezy naukowe tłumaczące udział i oddziaływanie białek w procesie inicjacji replikacji. Prezentuje też dalsze plany badań i nasuwające się pytania, wynikające z najnowszych danych literaturowych oraz wyników pracowni.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym zapytać:

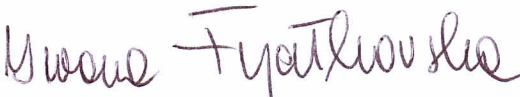
- Czy wiadomo dlaczego nie powiodły się próby skonstruowania białek TrfA zawierających inne zmiany w sekwencji aminokwasowej białka TrfA np. QLSAA czy AAALF? Dlaczego nie udało się oczyścić białek TrfA niosących mutacje G254D/S267L i dodatkowo posiadających zmiany w sekwencji pentapeptydu QLSELF?
- Dlaczego planowano badania z białkiem TrfA niosącym motyw ALSMA? Dlaczego akurat takie zmiany aminokwasowe zaplanowano?
- Czy Doktorantka zechciałaby porównać wpływ oddziaływań pomiędzy białkiem bakteryjnym Hda i β pierścieniem na mechanizm inicjacji replikacji chromosomu, z wpływem oddziaływanie białka TrfA- β pierścień na inicjację replikacji plazmidu.
- Czy fakt, że 16 aminokwasowy C-terminalny peptyd polimerazy IV DNA oddziałuje z tą samą sekwencją β pierścienia co białko TrfA, może powodować zahamowanie inicjacji plazmidu RK2 w warunkach nadprodukcji polimerazy IV DNA i odwrotnie?

Czy poszukiwania komponentu mogącego zablokować sekwencję pentapeptydu, bądź miejsce interakcji z pierścieniem beta mogą zaowocować terapią przeciwbakteryjną lub eliminującą plazmidy w komórkach bakteryjnych? Czy sekwencje te są atrakcyjnym celem poszukiwań?

W kilku miejscach należałoby zamienić określenie „forma dzika genu” na forma „typu dzikiego” i metoda Western blotting powinna być zawsze pisana z dużej litery, jako, że pochodzi od nazwiska autora.

Rozprawę Pani Aleksandry Wawrzyckiej oceniam bardzo wysoko. Rozprawa ta spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim. Została przygotowana nadzwyczaj starannie. Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i obrazuje wysoką ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Wawrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze ogólnobiologiczne znaczenie przeprowadzonych badań, nowatorstwo otrzymanych wyników, ich wysoką wartość merytoryczną oraz fakt opublikowania w prestiżowym międzynarodowym czasopiśmie *Proc. Natl. Acad. Sci USA* zwracam się z wnioskiem o stosowne wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska