

Gdańsk, 04.01.2017r

prof. dr hab. Michał Obuchowski
Zakład Bakteriologii Molekularnej
Dębinki 1
80-211 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Wawrzyckiej
zatytułowana
„Mechanizm wiązania polimerazy III *Escherichia coli* z origin plazmidu RK2”

Rozprawa mgr Aleksandry Wawrzyckiej dotyczy fundamentalnego procesu umożliwiającego powstanie i egzystencję wszelkich organizmów żywych – powielania informacji genetycznej, która ma zostać przekazana do komórek potomnych. Aby możliwe było powstanie organizmów żywych w odległej przeszłości musiało dojść do wytworzenia mechanizmu umożliwiającego przekazywanie informacji kolejnym generacjom. Jak ten proces odbywał się u zarania życia na Ziemi trudno powiedzieć, natomiast jest pewne, że od bardzo dawna wiąże się z zależną od cząsteczki macierzystej syntezą kwasów nukleinowych. Proces powielania nośników informacji genetycznej, kwasów nukleinowych, bez wątpienia był, i zapewne jest, udoskonalany przez organizmy żywe w toku ewolucji. Podstawy tego procesu poznaliśmy, w ludzkiej skali czasu, już dość dawno, to znaczy w roku 1956 Artur Kornberg izoluje enzym zdolny do polimeryzacji DNA a dwa lata później, Meselson i Stahl dostarczają dowodów doświadczalnych na semikonserwatywność tego procesu.

Dziś, 61 później, pomimo spektakularnego rozwoju biologii molekularnej całość procesu powielania materiału genetycznego ciągle nie jest w pełni poznana. Najlepszym tego dowodem jest lektura przedstawionej rozprawy doktorskiej Pani magister Aleksandry Wawrzyckiej, która dostarcza nowych informacji dotyczących szczegółowych informacji na temat funkcji niektórych białek zaangażowanych w replikację pochodnych plazmidu RK2. Przedstawione w rozprawie dane są oryginalne i z całą pewnością zasługują na miano odkrycia naukowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym opracowaniem o objętości 121 stron maszynopisu. Została ona podzielona w sposób typowy na spis treści, streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję oraz bibliografię. W pracy znajduje się również indeks skrótów, który nie został ujęty w spisie treści. Przy tej części rozprawy chciałbym się na chwilę zatrzymać.

Prowadzenie badań z zakresu biologii molekularnej, wymaga stosowania wielu skomplikowanych odczynników posiadających długie i nieporęczne nazwy. W związku z tym ilość stosowanych skrótów jest bardzo duża. Decyzja o umieszczeniu w rozprawie spisu jest ukłonem w stronę czytelnika, ale również rozwiązaniem ryzykownym. Ryzyko jest związane z koniecznością bardzo wnikliwej analizy tworzonej pracy i „wyłapania” wszystkich skrótów w niej pojawiających się. Spis zamieszczony przez Panią mgr Wawrzycką, niestety jest niekompletny i nieco niekonsekwentny.

MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII UG i GUMed

ul. Antoniego Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

tel. +48 58 523 63 20, fax. +48 58 523 64 30, e-mail: dziekanat@biotech.ug.edu.pl



Znajdujemy w nim np. ATP, ale już nie ADP, podobnie jest PMSF i SDS ale brakuje rozwinięcia skrótów KPi, TEMED czy HEPES. Brakuje, na przykład, skrótu DUE, który jest tylko wyjaśniony w tekście. Nie wiem czy nie „bezpieczniejszym” rozwiązaniem była by rezygnacja z tego elementu rozprawy.

Streszczenie

Jest to trudny element, ponieważ w dosłownie kilkunastu zdaniach trzeba zawrzeć kilka lat pracy. Doktorantka wychodzi z tarczą z tej próby, a streszczenie jest rzeczywiście krótkie i informatywne.

Wstęp

Ta część dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie tworzenia kompleksu enzymatycznego zdolnego do replikacji DNA plazmidów wyposażonych w *oriV* pochodzące z plazmidu RK2. Autorka w przejrzysty sposób przedstawia obecny stan wiedzy oraz kwestie, które wymagają wyjaśnienia. Mimo starannej redakcji Pani Wawrzycka nie ustrzegła się kilku błędów logiczno-semantycznych. W rozdziale 2.1.2 opisany jest kompleks polimerazy DNA III z *E. coli*. W zamieszczonym opisie znajdujemy stwierdzenie „.....jest ciągła synteza DNA jednej z matryc i przerywana drugiej. Nić matrycowa, której powielanie odbywa się w sposób ciągły.....” (str. 13), które nie jest zgodne z prawdą. Podczas replikacji DNA nie zachodzi synteza żadnej z nici matrycowych, a tylko na ich podstawie są syntetyzowane komplementarne nici potomne.

W tym samym rozdziale autorka opisuje produkty genu *dnaX* będące składnikami holoenzymu polimezy III DNA noszącymi nazwy τ i γ . Jest to bardzo ciekawy gen bakteryjny, który niejako „z założenia” daje dwa różne produkty białkowe. Jednak stwierdzenie doktorantki, że odbywa się to dzięki obecności alternatywnego kodonu „start” translacji jest błędne (str. 14). Prosiłbym o sprawdzenie i wyjaśnienie jak to się odbywa rzeczywiście.

Rycina 3, przedstawiająca porównanie sekwencji aminokwasowej białek oddziaływujących z pierścieniem β jest nieczytelna, prawdopodobnie z powodu „rozszczenia się” kolorów podczas druku.

Pod koniec rozdziału 2.2.2. (str. 31) znajduje się zdanie „Interesujące wydają się obserwacje dotyczące tworzenia przez domenę WH1 białka RepA plazmidu pPS10 struktur amyloidu, podobnie jak w przypadku białek PrP.....”. Przyznam się, że bardzo mnie ciekawi, dlaczego autorka uznała, że ten fakt jest interesujący. Poprosiłbym o kilka słów rozwinięcia.

Na kolejnej stronie (str. 32) czytamy „W komórkach *E. coli* białko TrfA jest wystarczające aby zainicjować otwarcie DNA w rejonie *oriV*, co pokazano w doświadczeniach z $KMnO_4$.” Przyznam się, że jest to dość zaskakująca informacja, że dzięki zastosowaniu nadmanganian potasu udało się uzyskać dane potwierdzające otwarcie DNA w rejonie *oriV*. Poprosiłbym o rozwinięcie tego skrótu myślowego i skomentowanie czy naprawdę $KMnO_4$ jest nie do zastąpienia w doświadczeniach, których natury się domyślałem.

Cel pracy

Jest on sformułowany, krótko i jasno. Nie mam uwag.

Materiały

Bardzo istotny rozdział dla ewentualnego powtórzenia lub skopiowania metodyki przeprowadzonych doświadczeń. Zredagowany starannie jednak nie bez błędnie. Moją uwagę zwróciły dwa bufory o różnym składzie i zastosowaniu (str. 36) ale o tej samej nazwie „TE”. Wprowadza to element niepewności, który konkretnie bufor stosowano w opisanych w dalszej części doświadczeniach.

Opisując skład dwóch chyba najczęściej stosowanych pożywek dla *E. coli* – LA i LB autorka podaje, że zawierały one 1% NaCl. Jednak po „rzuceniu okiem” do „Molecular Cloning” wyd. 4 upewniłem się, że standardowe stężenie chlorku sodu jest inne niż wskazano. Pytanie: czy stosowano zmodyfikowaną pożywkę LA i LB?

Na przysłowiową „złotą czcionkę” zasługują stężenia końcowe stosowanych w pożywkach antybiotyków wynoszące..... 50 a nawet 100g na mililitr (str. 38).

Metody

Rozdział równie ważny jak materiały, z tych samych powodów jak opisano powyżej. Napisany starannie, co musi być podkreślone, aby w tym kontekście spojrzeć na wymienione poniżej błędy i nieścisłości.

W opisie pierwszej metody w której wykorzystano wirowanie w gradiencie gęstości chlorku ceszu, rzuca się w oczy jego wzór sumaryczny CsCl_2 . Moje pytanie będzie takie: proszę wyjaśnić, dlaczego taka sól nie może powstać.

W opisie metody 5.18, podrozdziale „Oddziaływania pomiędzy białkami” znajdujemy stwierdzenie „...polegają na tworzeniu kowalencyjnych oddziaływań pomiędzy grupami...”. Z całości opisu wynika, że chodzi o tzw. sprzężanie aminowe, a więc tworzenie wiązań kowalencyjnych a nie oddziaływań.

Wyniki

Ten rozdział stanowi najciekawszą część rozprawy, ponieważ Pani mgr Wawrzycka prowadzi czytelnika krok po kroku śladem swoich eksperymentów oraz ich interpretacji i prezentuje nowe informacje dotyczące oddziaływań między białkami uczestniczącymi w formowaniu kompleksu enzymatycznego niezbędnego do replikacji DNA plazmidów posiadających *oriV*. Poszczególne eksperymenty są klarownie opisane z stosownymi odwołaniami do rozdziałów Materiały lub Metody. Uzyskiwane wyniki są prezentowane w formie rycin i tabel co pozwala na ich samodzielną ocenę. Pytanie, które ciśnie się na usta, dotyczy podrozdziału 6.3, w którym opisano analizę wariantów białka TrfA metodą dichroizmu kołowego. W rozdziale metody (str. 50, 5.14) widnieje stwierdzenie: „Przeprowadzenie pomiarów metodą dichroizmu kołowego zlecono Zespołowi Pracowni Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii UG” a w opisie doświadczenia na str. 63 czytamy „Analizę struktury drugorzędowej uzyskanych preparatów wykonałam metodą dichroizmu kołowego”. Proszę o wyjaśnienie co zostało wykonane w Pracowni Fizyko-Chemicznej a co wykonała autorka.

Na stronie 75 są zaprezentowane sensogramy pokazujące oddziaływanie wariantów białka TrfA z DNA. Czy prawie dwukrotny wzrost sygnału SPR obserwowany gdy analizowano białko TrfA ΔLF w stosunku do TrfA typu dzikiego można interpretować jako wzrost jego powinowactwa do DNA? Jaka inna interpretacja przedstawionych na rycinie 17 wyników jest możliwa?

Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń pokazują, że oddziaływanie białka TrfA z pierścieniem β prowadzi do utworzenia funkcjonalnego kompleksu replikacyjnego tylko w odniesieniu do super

zwiniętej matrycy. Można stąd wywnioskować, że prawidłowe formowanie się kompleksu replikacyjnego będzie zachodziło tylko w pewnym zakresie wartości gęstości superhelikalnej DNA plazmidowego. Czy były przeprowadzane próby wyznaczenia gęstości superhelikalnej stosowanych matryc? Kontynuując tą myśl, czy oba kierunki super-skręcenia (negatywny i pozytywny) mogły by mieć podobny wpływ na formowanie się kompleksu replikacyjnego w analizowanym układzie?

Dyskusja

W ostatnim rozdziale „tekstowym” Pani mgr Aleksandra Wawrzycka konfrontuje otrzymane przez siebie wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi. Ponownie mamy okazję przejść całą ścieżkę doświadczeń i ich interpretacji zaprezentowaną w poprzednim rozdziale i poznać znaczenie uzyskanych wyników w szerszym kontekście wykraczającym po za pochodne plazmidu RK2. Autorka, nie tylko komentuje uzyskane przez siebie nowe wiadomości o wzajemnych zależnościach pomiędzy komponentami aparatu replikacyjnego ale również wskazuje na braki w istniejącym stanie wiedzy i kierunki dalszych prac niezbędnych w celu poznania wszystkich szczegółów formowania się *de novo* kompleksu replikacyjnego oraz jego skutków w postaci odpowiedniego ukierunkowania widełek replikacyjnych. Rozdział ten jest napisany przejrzyście z pewną powściągliwością, która zawsze powinna charakteryzować badacza, ponieważ on najlepiej, pomimo całej swojej wiedzy zdaje sobie sprawę z ilości nie wyjaśnionych elementów zachodzących w analizowanym procesie. W tym rozdziale chciałbym tylko prosić o komentarz do zdania (str. 104) „....., że primaza jest zdolna do syntezy startera z użyciem deoksyrybonukleotydów lub ATP.”. Takie sformułowanie nie jest jasne. Z jakich trójfosfonukleotydów primaza faktycznie syntetyzuje primer, a jaką rolę w tym procesie pełni lub może pełnić ATP.

Bibliografia

Spis cytowanej literatury zajmuje aż 10 stron tekstu, co wskazuje na duże oczytanie w literaturze przedmiotu. Autorka we wcześniejszych rozdziałach odwołuje się nawet do artykułów dopiero przyjętych do druku co wskazuje na bardzo uważne śledzenie postępu prac w swojej dziedzinie. Moja uwaga krytyczna do spisu literatury dotyczy nie zachowania konwencji pisania nazw gatunkowych kursywą. We wszystkich cytowanych pracach (z wyjątkiem rozprawy doktorskiej Sławomira Kubika, str. 116) występujące w tytułach nazwy gatunkowe bakterii są pisane „prostą” czcionką. Nie jest to wielki błąd, lecz nie widzę powodu aby iść pod prąd ogólnym zasadom.

Ogólne uwagi edytorskie

Praca jest napisana starannie, poprawnym i zrozumiałym językiem polskim. Terminologia jest stosowana prawidłowo. Tekst zawiera niewielką ilość błędów pisarskich. Z obowiązku recenzenta wypada mi powiedzieć, że kilka typowych błędów zakradło się jednak do pracy. Są to: stosowanie kropki jako dzielnika dziesiętnego, nie jednolite opisy warunków wirowania (obr/min, rpm, czasem podany typ rotora). Autorka też z rzadka stosuje żargon laboratoryjny lub skróty myślowe typu: gen białka, zmutowana nić DNA, delecja leucyny czy całkowite zaburzenie.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska zawiera oryginalne rozwiązanie problemu badawczego jakim była analiza oddziaływania białka TrfA z pierścieniem β polimerazy III DNA z *Escherichia coli*. Przedstawione wyniki są nowością i mają stosunkowo duże znaczenie ogólnobiologiczne, ponieważ pozwalają na wyjaśnienie przyczyn które determinują kierunek replikacji w przypadku procesu zachodzącego tylko w jedną stronę (preferencyjne wiązanie się inicjatorowego białka TrfA do jednej nici *oriV*). Uzyskane wyniki mogą być z powodzeniem przeniesione z pewnymi modyfikacjami na inne replikony pozwalając na ich dokładniejsze poznanie. O randze uzyskanych wyników świadczy ich opublikowanie w jednym z czołowych czasopism naukowych z dziedziny (PNAS), gdzie Pani magister Wawrzycka jest pierwszym autorem.

W związku z powyższym mogę z całą pewnością stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska spełnia wymogi pracy doktorskiej określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2013 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (Dz.U. nr 65, poz. 595, Dz.U nr 164 poz. 1365, Dz.U nr 84 poz. 455 z późniejszymi zmianami). Dlatego też wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed do dopuszczenia Pani magister Aleksandry Wawrzyckiej do dalszych części przewodu doktorskiego. Równocześnie, mając na uwadze duże znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju biologii molekularnej wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

M. Gubelski