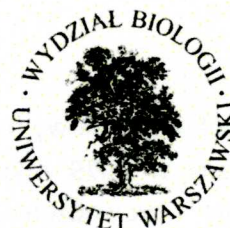




UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej, pt.

„Powiązania między replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi *Escherichia coli* oraz ich rola w koordynacji bakteryjnego cyklu komórkowego”

wykonanej w *Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii* Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Moniki Glinkowskiej, prof. UG

Przebieg podstawowych procesów życiowych bakterii jest ściśle skoordynowany w cyklu komórkowym. Wymaga to działania precyzyjnych, wielopłaszczyznowych mechanizmów regulacyjnych, które integrują m.in. informacje dotyczące stanu fizjologicznego i metabolicznego komórki oraz warunków jej bytowania. Zrozumienie tych mechanizmów wymaga holistycznego spojrzenia na komórkę, uwzględniającego zarówno złożoność sieci zachodzących w niej procesów, jak i rolę nadrzędnych czynników regulatorowych. Replikacja chromosomowego DNA odgrywa tu zasadniczą rolę, bowiem sygnały powiązane z jej przebiegiem stanowią istotny wskaźnik stanu komórki w cyklu komórkowym i jej gotowości do rozpoczęcia podziału. Kontrola nad przebiegiem tego procesu, w ujęciu globalnym, stanowi interesujący i istotny naukowo wątek badawczy. Oceniana rozprawa ściśle wpisuje się w ten nurt tematyczny, bowiem Doktorantka postawiła sobie za cel weryfikację hipotezy, zakładającej, że czynniki powiązane z różnymi procesami metabolicznymi mogą bezpośrednio oddziaływać z białkami zaangażowanymi w regulację i przebieg replikacji DNA, modulując ich aktywność i koordynując replikację DNA z tempem wzrostu komórki bakteryjnej.

Jako modelowy organizm w badaniach wykorzystano bakterię *Escherichia coli*. Poszczególne zadania badawcze obejmowały: (i) identyfikację i analizę interaktomów grupy białek powiązanych z replikacją DNA, w hodowlach prowadzonych w różnych warunkach, (ii) określenie wpływu delecji wybranych genów (*rfaD*, *rlmE* i *bamB*) na timing inicjacji replikacji w cyklu komórkowym bakterii, oraz (iii) zbadanie roli oddziaływań białka regulatorowego DiaA oraz wewnątrzkomórkowego poziomu sedoheptulozo-7-fosforanu na regulację inicjacji replikacji. Były to zatem wielopłaszczyznowe badania, których wyniki zostały przedstawione w 4 pracach badawczych (w jednym opublikowanym artykule, 2 upublicznionych preprintach i jednym nieopublikowanym manuskrypcie), stanowiących zasadniczą część recenzowanej rozprawy. Do tego zestawu włączono

także artykuł przeglądowy (*When size matters – coordination of growth and cell cycle in bacteria*, opublikowany w 2019 roku w *Acta Biochimica Polonica*; praca nr 1), który odbieram jako uzupełnienie wprowadzenia przedstawionego w komentarzu do rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że jest to oryginalne i wartościowe opracowanie, przedstawiające zagadnienia związane z koordynacją cyklu komórkowego w ujęciu badań eksperymentalnych i obliczeniowych dotyczących pojedynczych komórek bakteryjnych. W świetle tych danych, krytycznie zostały omówione modele regulacji przebiegu kluczowych procesów w cyklu komórkowym. Konkluzje zawarte w tej pracy stanowią dobre przejście do postawionego celu naukowego rozprawy.

Cykl prac oryginalnych rozpoczyna artykuł pt. *Interaction networks of Escherichia coli replication proteins under different bacterial growth conditions*, opublikowany w czasopiśmie *Scientific Data* (IF 6,92; 140 p. MNiSW; praca nr 2). W pracy tej podjęto działania w kierunku zdefiniowania globalnych interaktomów grupy białek zaangażowanych w przebieg i regulację procesu replikacji DNA. Badania te przeprowadzono według wspólnego schematu eksperymentalnego, którego podstawę stanowiło stworzenie w chromosomie *E. coli* fuzji translacyjnych analizowanych genów, celem uzyskania białek fuzyjnych wyznakowanych peptydowym znacznikiem SPA. Pozwoliło to w kolejnych etapach na identyfikację puli białek potencjalnie oddziałujących z białkiem fuzyjnym, z zastosowaniem chromatografii powinowactwa oraz spektrometrii mas (AP-MS), a następnie analizę danych przy użyciu oprogramowania MaxQuant. Mocną stroną tych badań był ich kompleksowy wymiar (analizie poddano aż osiem białek uczestniczących na różnych etapach procesu replikacji DNA, w hodowlach bakterii o zróżnicowanym tempie wzrostu komórek), a także zastosowanie odpowiednich układów kontrolnych i testów statystycznych, co pozwoliło na ograniczenie zakresu niespecyficzných interakcji.

Wyniki tych analiz nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków na temat oddziaływań analizowanych białek, nie mniej jednak potwierdzają one niektóre wcześniej zdefiniowane interakcje. Zasadniczą wartością tej pracy jest zatem zgromadzenie obszernego i wartościowego zestawu danych, wskazujących na występowanie złożonych interaktomów specyficznych dla badanych białek, podlegających dynamicznym zmianom w kolejnych etapach wzrostu hodowli bakteryjnej. Uzyskane wyniki pozwalają na wskazanie potencjalnych partnerów oddziaływań, jednak należy podkreślić, że każda modyfikacja białka, nawet jeśli nie zaburza jego podstawowych funkcji, może wpływać na specyfikę interakcji z innymi cząsteczkami. Jest to ograniczenie nieodłącznie wpisane w tego typu podejście eksperymentalne. Niewątpliwie, zgromadzone dane otwierają nowe możliwości badawcze. W skład zidentyfikowanych interaktomów wchodzi białka pełniące różne funkcje, zatem pozytywna weryfikacja sugerowanych interakcji może doprowadzić do identyfikacji nowych mechanizmów regulacyjnych łączących replikację DNA z innymi procesami komórkowymi.

Wyniki te przed publikacją przeszły wnikliwą recenzję. Mam jednak pytanie dotyczące dwóch rycin zamieszczonych w tej pracy, Fig. 6 i Fig. 7 (obie o bardzo słabej rozdzielczości), przedstawiających krzywe wzrostu testowanych szczepów bakterii. W tekście pracy jest wzmianka

o braku istotnych różnic w kinetyce wzrostu szczepów dzikiego i zmodyfikowanych, jednak w niektórych przypadkach różnice te są wyraźnie widoczne, szczególnie podczas wzrostu bakterii na podłożu minimalnym. Może to sugerować, że wprowadzone modyfikacje genetyczne nie są w pełni obojętne. Poprosiłbym o skomentowanie tych wyników.

Omawiany artykuł kładzie nacisk na opis strategii pozyskiwania danych oraz ich walidacji i oceny jakości, dzięki czemu dostarcza cennych wskazówek dla badaczy planujących podobne podejścia eksperymentalne. Ze względu na specyfikę układu pracy, nie przedstawiono w niej szczegółowej interpretacji wyników i dyskusji na temat biologicznego znaczenia sugerowanych interakcji. Dane te zostały jednak poddane bardziej wnikliwej analizie w kolejnym manuskrypcie włączonym do rozprawy, zatytułowanym: *Protein interaction network analysis reveals growth conditions-specific crosstalk between chromosomal DNA replication and other cellular processes in E. coli* (w tytule powinna zostać podana pełna nazwa rodzajowa bakterii). Lektura tej pracy (upublicznionej w Biorvix w 2021 roku; praca nr 3) budzi pewne wątpliwości, gdyż jej wyniki są w dużej mierze tożsame z wynikami omawianego wcześniej artykułu, opublikowanego w 2023 roku w *Scientific Data*. Manuskrypt ten przedstawia zapewne pierwotną koncepcję sposobu prezentacji wyników dotyczących identyfikacji i analizy interaktomów. Przedstawienie tych samych eksperymentów w dwóch manuskryptach rozprawy jest, w mojej opinii, niefortunne; w tym przypadku wskazane byłoby przeredagowanie wcześniej przygotowanego manuskryptu w celu uniknięcia powtórzeń.

Omawiana praca, oprócz głębszej interpretacji danych, również w odniesieniu do bazy STRING, wprowadza także nowe wątki eksperymentalne, dotyczące dwóch wybranych potencjalnych interaktantów: (a) metylotransferazy 23S rRNA występującej w interaktomie białka NrdB oraz (b) 6-epimerazy ADP-L-glicero-D mannoheptozy (enzymu zaangażowanego w syntezę prekursora rdzenia LPS) z interaktomów SeqA. Doktorantka zmutowała te geny w chromosomie *E. coli*, a uzyskane szczepy zbadała metodą cytometrii przepływowej, analizując zawartość DNA w komórkach po zatrzymaniu replikacji (ang. *replica on run-out assay*).

Uzyskane wyniki pokazały, że niezależne delecje genów obu białek zaburzają regulację replikacji w cyklu komórkowym, a zaobserwowane efekty mutacji są zależne od stanu metabolicznego bakterii. Należy jednak z dużą ostrożnością interpretować te wyniki, tym bardziej, że w grę mogą wchodzić również efekty polarne mutacji (nie przeprowadzono w testów komplementacyjnych) czy też efekty plejotropowe, które pośrednio mogą prowadzić do zaburzenia procesów regulacyjnych. Nie mniej jednak poczynione obserwacje zachęcają do dalszego badania tych potencjalnych oddziaływań. Tym bardziej, że zademonstrowanie regulacyjnych powiązań replikacji DNA z procesami biogenezy rybosomów czy syntezy komponentów powłok komórkowych, miałyby istotną wartość poznawczą. Czy badania te kontynuowano?

Metodę cytometrii przepływowej Doktorantka zastosowała także w innych badaniach, opisanych w pracy pt. *Bam complex associated proteins in Escherichia coli are functionally linked to peptidoglycan biosynthesis, membrane fluidity and DNA replication* (praca nr 4). Praca ta, licząca aż 16 współautorów, została upublicziona w czasopiśmie eLife w 2024 roku w formie recenzowanego

preprintu. Chociaż Doktorantka nie zajmuje wyróżnionej pozycji w gronie współautorów, przeprowadzone przez nią eksperymenty stanowią odrębną, spójną i ważną tematycznie część całego projektu.

Zasadniczym celem tej pracy było przeprowadzenie kompleksowej analizy funkcji sześciu białek pomocniczych związanych z kompleksem BAM (ang. *β -barrel assembly machinery*), odgrywającym ważną rolę w biogenezie bakteryjnej błony zewnętrznej. Doktorantka wykazała, że jeden z analizowanych mutantów, defektywny w genie *bamB*, charakteryzuje się zwiększoną liczbą chromosomów oraz asynchroniczną replikacją DNA, co sugerowało, że wprowadzona delecja prowadzi do zwiększenia częstości inicjacji replikacji chromosomu. Zaproponowanie związku funkcji lipoproteiny BamB z regulacją replikacji DNA stanowi wartościowy aspekt całej pracy. Należy jednak zauważyć, że w badaniach przedstawionych w prepryncie (a zatem również w przypadku mutacji $\Delta bamB$) brakuje eksperymentów komplementacyjnych, które stanowią istotną kontrolę w analizie mutantów bakteryjnych.

Ostatnia z przedstawionych w rozprawie prac nosi tytuł: *Interaction of the replication factor DiaA and primary metabolite sedoheptulose 7-phosphate regulates DNA replication in Escherichia coli* (praca nr 5). Punktem wyjścia do opisanych w niej badań była obserwacja wskazująca na obecności w strukturze białka DiaA wariantu domeny SIS (ang. *Sugar ISomerase*) charakterystycznej dla enzymu GmhA, który wiąże i izomeryzuje D-sedoheptulozo-7-fosforan (S7P) w szlaku pentozofosforanowym. Obserwacja ta sugerowała możliwość bezpośredniego oddziaływania DiaA z S7P. Ponieważ DiaA pełni rolę pozytywnego regulatora białka inicjacyjnego DnaA, interakcje takie mogłyby wpływać na aktywność DiaA, a pośrednio modulować proces inicjacji replikacji chromosomu. Hipoteza ta została w omawianej pracy zweryfikowana eksperymentalnie. W toku badań wykazano m.in. bezpośrednie interakcje tego metabolitu z DiaA, zidentyfikowano resztę aminokwasową w domenie SIS krytyczną dla wiązania S7P oraz zademonstrowano wpływ tej oraz innych mutacji na regulację replikacji w cyklu komórkowym. Z kolei kluczowe eksperymenty *in vitro* dostarczyły wyników wskazujących, że analizowany metabolit może pełnić rolę negatywnego modulatora aktywności DiaA, osłabiając zdolność tego białka do stymulowania oligomeryzacji DnaA w rejonie origin replikacji.

Zaproponowany w tej pracy model łączy zatem regulację inicjacji replikacji DNA z podstawowym metabolizmem komórki, wskazując jako cząsteczkę sygnałową metabolit szlaku pentozofosforanowego uczestniczący w biosyntezie prekursorów nukleotydów oraz składników osłon komórkowych. Jest to jeden z kluczowych wniosków ocenianej rozprawy. Wątek powiązania biogenezy osłon komórkowych z regulacją procesu replikacji DNA pojawia się w kilku miejscach rozprawy. Jak Doktorantka widzi możliwości dalszego rozwoju badań, które powinny doprowadzić do poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska. Czy niekanoniczne formy domen SIS występują również w innych białkach *E. coli* zaangażowanych w odmienne procesy komórkowe (?) – być może tego typu regulacja ma wymiar znacznie bardziej globalny.

Chciałbym podkreślić, że zawarte w recenzji uwagi nie wpływają na moją pozytywną opinię na temat całości rozprawy. Doceniam podjęcie się realizacji trudnego, a jednocześnie bardzo interesującego zagadnienia badawczego. Analiza oddziaływań i mechanizmów regulacyjnych w skali globalnej stanowi duże wyzwanie, zarówno pod względem eksperymentalnym, jak i na etapie interpretacji danych, co wynika m.in. z wielopoziomowego charakteru procesów regulacyjnych oraz dużej dynamiki zachodzących zmian, zależnych od stanu fizjologicznego komórki. Jednocześnie należy podkreślić, że podjęta tematyka ma istotne znaczenie poznawcze i wpisuje się w aktualne kierunki badań w tej dziedzinie. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią dobrą podstawę do dalszego rozwoju tej tematyki, szczególnie w zakresie opisanych interaktomów oraz powiązania etapu biogenezy osłon komórkowych z procesem replikacji DNA.

Analiza formalnej strony rozprawy

Oceniana rozprawa została przedstawiona w formie zbioru publikacji /manuskryptów prac badawczych. Zawiera ponadto streszczenie(w języku polskim i angielskim), a także komentarz obejmujący kolejno: wprowadzenie do tematyki badawczej, sprecyzowany cel badań, omówienie poszczególnych prac eksperymentalnych, wnioski wynikające z tych badań, jak również wykaz stosowanych skrótów oraz spis literatury. Na końcu rozprawy zamieszczono informacje dotyczące finansowania badań oraz imponującego dorobku naukowego Doktorantki, który świadczy o Jej szerokich zainteresowaniach naukowych. Ta część została przygotowywana poprawnie i starannie. Z obowiązku recenzenta wspomnę jedynie o kilku drobnych uchybieniach redakcyjnych, takich jak błędne przywoływanie ryciny nr 6 (Fig. 6) z artykułu nr 2 (str. 18), stosowanie terminu metylaza zamiast metylotransferaza (str. 11) oraz nieużywanie w tekście skrótowej nazwy rodzajowej bakterii (np. str. 9, 12-17).

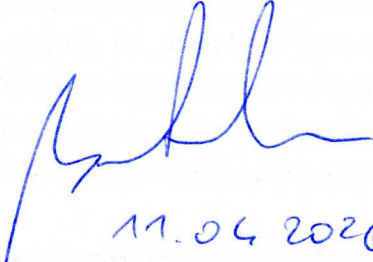
Doktoranta jest pierwszym autorem prac nr 1, 2 i 3 oraz równorzędnym pierwszym autorem w pracy nr 5. Analiza oświadczeń Doktorantki i współautorów przekonuje o istotnej roli, jaką odegrała w prowadzeniu badań oraz przygotowaniu manuskryptów prac. Należy podkreślić, że część tych badań była realizowana ze środków kierowanego przez nią projektu Preludium.

Wniosek końcowy

W świetle warunków określonych w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) stwierdzam, że przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego powiązań między replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi *E. coli* oraz ich roli w koordynacji cyklu komórkowego. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem specjalistycznego warsztatu badawczego, a zarówno zaplanowanie eksperymentów, jak i analiza oraz interpretacja uzyskanych

danych świadczą o rozległej wiedzy teoretycznej w zakresie dyscypliny nauki biologiczne. Potwierdza to także współautorstwo pracy przeglądowej dotyczącej podjętej tematyki.

W związku z tym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



11.04.2026