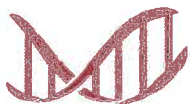


Łódź, 5 marca 2026

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*  
Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej pt. „Powiązania między replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi *Escherichia coli* oraz ich rola w koordynacji bakteryjnego cyklu komórkowego”.**

Sukces ewolucyjny mikroorganizmów w dynamicznych niszach ekologicznych zależy od ich plastyczności adaptacyjnej, której fundamentem jest precyzyjna kontrola inicjacji replikacji DNA. Proces ten musi być ściśle zsynchronizowany z cyklem podziałowym oraz aktualnym statusem metabolicznym komórki, tworząc zintegrowaną sieć zależności pozwalającą na optymalne zarządzanie zasobami. Kluczową strategią przetrwania, zarówno dla saprofitów, jak i groźnych patogenów, jest zdolność do modulacji tempa replikacji: od intensywnej proliferacji w warunkach sprzyjających, po drastyczne spowolnienie metabolizmu w odpowiedzi na stres. U bakterii chorobotwórczych redukcja częstotliwości inicjacji replikacji DNA nie tylko umożliwia właściwą alokację energii, ale stanowi również mechanizm obronny, sprzyjający tolerancji na antybiotyki oraz unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Mimo że mechanizmy kontroli replikacji zostały szczegółowo opisane na poziomie molekularnym dla organizmów modelowych, takich jak *Escherichia coli*, nasza wiedza na temat ich integracji z innymi szlakami metabolicznymi, zarówno w warunkach intensywnego wzrostu jak i w warunkach ekstremalnych wydaje się wciąż niekompletna. Doktorantka podjęła się trudu uzupełnienia naszej wiedzy w tym zakresie badając powiązania między replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi na modelu pałeczki okrężnicy. Podejście metodyczne do postawionego problemu naukowego obejmujące zarówno szerokie badania przesiewowe na poziomie globalnych oddziaływań białek jak i precyzyjne wyjaśnianie znaczenia zdolności białka procesu inicjacji replikacji do wiązania określonego metabolitu i znaczenia tego procesu dla inicjacji replikacji



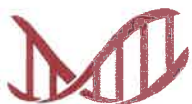
DNA gwarantowała świetny poziom merytoryczny i doskonałą jakość naukową realizowanych badań.

Dysertacja Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej ma charakter hybrydowy i przygotowana została w postaci zarówno opublikowanych jak i nieopublikowanych prac. W skład dysertacji weszła jedna praca pogładowa opublikowana w 2019 roku w *Acta Biochem. Polonica*; oraz cztery prace eksperymentalne, z których jedna została opublikowana w *Sci. Data* w 2023 roku. Pozostałe 3 prace eksperymentalne zostały przedstawione w postaci preprintów (dwie) lub manuskryptu. W czterech z ww. prac Doktorantka jest pierwszym lub współpierwszym autorem a załączone oświadczenia nie budzą wątpliwości co do jej wiodącej roli w tych publikacjach. W pracy zawartej w postaci preprintu znajdującego się w recenzji w czasopiśmie *eLife* Pani J. Morcinek-Orłowska jest 6 z 16 autorów zgodnie z niewielkim wkładem jaki miała w powstanie tej pracy. Pominięcie tej pracy w dysertacji, nawet z włączeniem wykonanego przez Doktorantkę doświadczenia w części uzupełniającej manuskrypty, wydaje się chyba lepszym rozwiązaniem.

Załączone przez Doktorantkę publikacje/manuskrypty zostały poprzedzone poprzez krótkie wprowadzenie, cel pracy, omówienie prac eksperymentalnych, wnioski i dyskusję co uważam za bardzo cenne, pozwalające czytelnikowi na postrzeganie zbioru przedstawionych manuskryptów jako jedną spójną całość. Doktorantka zawarła także streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim. Zamieszczone przez Doktorantkę „Wprowadzenie” odnosi się jednocześnie do pracy pogładowej wchodzącej w skład dysertacji i stanowi jej pewne uzupełnienie co biorąc pod uwagę fakt, że praca ta została opublikowana w 2019 roku wydaje się w pełni uzasadnione. Doktorantka pisząc o koordynacji cyklu komórkowego bakterii na podstawie danych wysokoprzepustowych z pojedynczych komórek wskazuje, że „kontrola rozmiaru w progresji cyklu komórkowego nie opiera się na osiągnięciu całkowitego rozmiaru krytycznego (‘sizer’), lecz na dodawaniu stałej objętości, niezależnie od początkowego rozmiaru komórki (‘adder’). **Ciekawy jestem na ile to stwierdzenie jest uniwersalne i dotyczy różnych typów podziałów komórkowych w tym podziału symetrycznego jak u *E. coli*, asymetrycznego jak u mykobakterii charakteryzujących się wzrostem biegunowym czy dimorficznego cykl życiowego *Caulobacter crescentus*. Proszę Doktorantkę o komentarz na ten temat podczas obrony.** Doktorantka bardzo precyzyjnie określiła cel pracy, którym było określenie powiązań pomiędzy replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi (ze

szczególnym uwzględnieniem metabolizmu) w modelowej Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli*. Za właściwe uważam także ograniczenie celów szczegółowych do badań, których Doktorantka była wiodącym autorem w ramach wieloautorskich publikacji/manuskryptów.

W pierwszej z prac eksperymentalnych opublikowanej w Sci. Data w 2023 roku autorzy podjęli się opracowania interaktomu dla wybranych białek replikacyjnych *E. coli* w różnych warunkach wzrostu. Doktorantka zakładała, że identyfikacja zmian w sieciach interakcji konkretnych białek w zależności od tempa wzrostu komórek może przyczynić się do odkrycia mechanizmów wykorzystywanych przez bakterie do dostosowywania fizjologii komórki do dostępności składników odżywczych. W dobrze przemyślanym podejściu metodycznym do identyfikacji interakcji białkowych autorzy wykorzystali chromatografię powinowactwa sprzężoną ze spektrometrią mas wykorzystując w charakterze przynęty 8 białek w tym białko inicjatorowe DnaA, białka regulatorowe replikacji DiaA, Hda i SeqA, komponenty replisomu takie jak helikazę DnaB, prymazę DnaG oraz podjednostkę  $\psi$  polimerazy DNA III Hold, a także podjednostkę  $\beta$  reduktazy rybonukleotydowej, NrdB. Kompleksy białek oczyszczano dzięki fuzji badanych białek z sekwencją tandemowego znacznika SPA. Oczyszczone kompleksy białkowe analizowano w tandemowej spektrometrii mas poprzedzonej chromatografią cieczową (LC-MS/MS). Uzyskane dane analizowano zarówno pod kątem jakościowym jak i ilościowym porównując próby badane z precyzyjnie dobranymi kontrolami w celu odróżnienia rzeczywistych oddziaływań od tła charakterystycznego dla zastosowanej metody badawczej. W opublikowanej pracy autorzy ograniczyli się do walidacji i oceny jakości uzyskanego zestawu danych AP-MS, bez szczegółowej analizy znaczenia biologicznego uzyskanych interakcji. Na uwagę zasługuje bardzo staranne graficzne przedstawienie uzyskanych wyników oraz zdeponowanie danych wyjściowych w odpowiednich bazach pozwalających na ich wykorzystanie przez innych badaczy. AP-MS jak każda metoda przesiewowa ma swoje ograniczenia, zastanawiam się czy Doktorantka rozważała zastosowanie innego podejścia metodycznego, choćby kontrolnie, z wykorzystaniem ligazy biotyny (BirA biotin ligase) np. w systemie miniTurbo, który jest coraz częściej używany do badania oddziaływań (bliskości) białek w komórkach zarówno w systemach eukariotycznych jak i u bakterii. **Proszę Doktorantkę o wskazanie przewag i ograniczeń tej metody w stosunku do AP-MS.** Mam również pytanie dotyczące Fig. 7 zamieszczonej w publikacji. **Porównując wzrost szczepu dzikiego oraz mutantów z „otagowanymi” białkami dla DnaG, NrdS, Hda można**



**zauważyć, że wzrost mutantów jest spowolniony w porównaniu do szczepu dzikiego, czy nie wynika to z zaburzenia funkcjonalności rekombinowanych białek i czy nie może to zmieniać oddziaływań pomiędzy przynętą a obserwowanymi interakcjami?**

Trzeci artykuł wchodzący w skład dysertacji ma charakter preprintu zamieszczonego w 2021 roku w bioRxiv. Artykuł ten jest w zamyśle pogłębieniem analiz AP-MS opublikowanych w Sci. Data gdzie Autorzy przechodzą od opisu interaktomów, przez analizę funkcjonalną, do określenia biologicznego znaczenia wybranych powiązań. Doktorantka zwraca uwagę, że duża część interaktomu analizowanych białek replikacyjnych to białka rybosomalne a największe ich wzbogacenie obserwowano dla „przynęt” SeqA oraz DnaA. **Ciekawy jestem jakie wg Doktorantki znaczenie funkcjonalne może mieć wiązanie przez białka replikacyjne poszczególnych białek rybosomalnych a nie całych rybosomów?** Interesujące są też obserwacje Doktorantki wskazujące na białka zaangażowane w wiązanie i procesowanie RNA w tym białka degradosomu identyfikowane w interaktomie białek DnaA, DnaB, DnaG i SeqA co tłumaczy potencjalnym zaangażowaniem degradosomu w zapobieganie akumulacji hybryd RNA-DNA (w tym pętli R) w genomie wpływającym na procesywność replisomu i stabilność DNA. Obserwowane interakcje dotyczą także białek błonowych, enzymów zaangażowanych w biogenezę powłok komórkowych czy białek odpowiedzialnych za potencjał oksydacyjno-redukcyjny komórki. Poza analizą wyników AP-MS, dla weryfikacji zależności funkcjonalnej identyfikowanych oddziaływań, Doktorantka badała wpływ delekcji genów kodujących metylotransferazę 23S rRNA oddziałującą z NrdB oraz 6-epimerazę ADP-L-glicero-D-mannoheptozy (synteza LPS) występującą w sieciach interakcji SeqA. Szczepy delecyjne były poddane analizie zawartości DNA w komórkach, metodą cytometrii przepływowej po zatrzymaniu replikacji. Autorzy wykazali, że delekcje obu analizowanych genów zaburzają regulację replikacji w cyklu komórkowym konkludując, że mogą one uczestniczyć w mechanizmach kontroli czasu replikacji w cyklu komórkowym, a ich udział jest zależny od warunków wzrostu, a co za tym idzie, stanu metabolicznego komórki. Przedstawiona interpretacja jest atrakcyjna, ale wymagałaby przeprowadzenia szeregu dalszych eksperymentów oraz zaproponowania molekularnego mechanizmu regulującego ten proces. **Proszę Doktorantkę o zaproponowanie dalszych eksperymentów wyjaśniających mechanizm obserwowanego zjawiska.** Charakterystyka wyników AP-MS przedstawiona przez Doktorantkę w tej części Dysertacji (Omówienie prac eksperymentalnych) jest bardzo dobrym uzupełnieniem publikacji z



Sci. Data. Integralną częścią Dysertacji jest także ww. preprint zamieszczony w 2021 roku w bioRxiv. W moim odczuciu, manuskrypt ten jest jednak w znacznej mierze powtórzeniem opublikowanej własnej pracy w Sci. Data, opisując ponownie uzyskanie interaktomu dla badanych białek replikacyjnych w różnych warunkach wzrostu. Najlepszym tego przykładem są zamieszczone w pracy ryciny w których Fig. 5 preprintu jest powtórzeniem supplementary Fig. 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h z artykułu w Sci. Data, Fig. 6 jest identyczna jak Fig. 11 w Sci. Data, a Fig. 7 powtarza Fig. 10 w Sci. Data. Autorzy preprintu nie odnoszą się w żadnej mierze do opublikowanej pracy w Sci. Data a praca ta nie jest cytowana w spisie literatury. Znaczną część preprintu można uznać jako autoplgiat dlatego uważam, że ten preprint nie powinien znajdować się w Dysertacji aby nie mierzyć się w przyszłości z takim zarzutem. Domyślam się, że preprint powstał przed publikacją w Sci. Data a opublikowana praca jest jego zaakceptowaną w czasopiśmie wersją, dlatego tym bardziej oba artykuły (Sci. Data oraz bioRxiv) nie powinny wchodzić w skład dysertacji.

W skład dysertacji Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej weszła także praca będąca recenzowanym preprintem w czasopiśmie eLife. Manuskrypt od września 2024 roku ma status „not revised” a głównym zarzutem recenzentów, który również podzielim, tej bardzo bogatej metodycznie oraz wynikowo i niewątpliwie ciekawej pracy, jest brak włączenia do badań komplementowanych szczepów. Doktorantka jest 6 z kilkunastu autorów pracy a jej wkład w jej powstanie ogranicza się do oceny zawartości DNA w komórkach po zatrzymaniu replikacji, metodą cytometrii przepływowowej. Ta wieloautorska publikacja jest dowodem na umiejętność współpracy międzynarodowej Doktorantki, lecz ze względu na skromną rolę w jej powstaniu włączenie jej jako integralnej części Dysertacji uważam za niewłaściwe. Przeprowadzone badania przez Doktorantkę można było przedstawić w części opisowej a pracę załączyć jako suplement.

Niewątpliwie wiodącą rolę Doktorantka odgrywała w załączonym manuskrypcie opisującym oddziaływanie białka DiaA z 7-fosforan sedoheptulozy i wyjaśniającym znaczenie tego oddziaływania dla regulacji inicjacji procesu replikacji. Badania struktury krystalicznej DiaA ujawniła obecność konserwowanej domeny izomeryazy cukrowej odpowiadającej domenie obecnej w enzymie GmhA szlaku syntezy heptozy, kluczowego prekursora rdzenia LPS. Zastosowanie znakowanego radioaktywnie substratu oraz testu EMSA pozwoliło na potwierdzenie oddziaływań DiaA z S7P. Autorzy przygotowali też kolekcję 17 zmutowanych wariantów DiaA z substytucjami AA w badanej domenie i zidentyfikowali substytucję, która



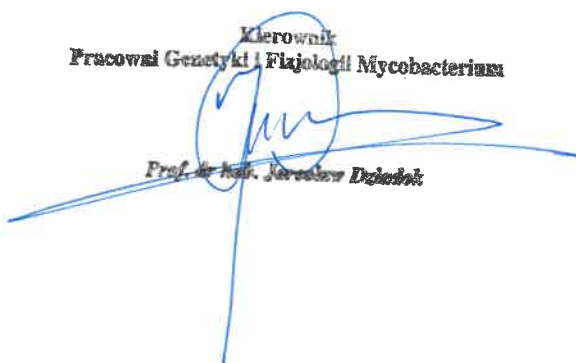
upośredzała wiązanie S7P oraz inne wpływające na zdolność tworzenia tetramerów. Ponadto Doktorantka analizowała zależność pomiędzy obecnością badanych mutacji a procesem inicjacji replikacji, w układzie kontrolnym obniżyła poziom S7P w komórkach poprzez inaktywację genu *tktA* a także badała funkcjonalność rekombinowanych DiaA w promowaniu wiązania DnaA do *oriC*. Przeprowadzone badania upoważniają Doktorantkę do stwierdzenia, że S7P pełni funkcję negatywnego modulatora aktywności białka DiaA co uważam za bardzo istotny wkład Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej w zrozumieniu złożonych systemów regulujących proces replikacji DNA u bakterii. **Ciekawy jestem jak Doktorantka z punktu widzenia ewolucyjnego wyjaśni wykorzystanie tego metabolitu (S7P) w regulacji inicjacji replikacji oraz czy uważa, że również inne metabolity mogą pełnić podobne funkcje oddziałując z enzymami procesu replikacji.** W manuskrypcie pracy na podstawie analizy EMSA Doktorantka pisze, że siła wiązania S7P do obu badanych białek jest podobna, myślę, że takie stwierdzenie wymagałoby wykonania dodatkowych pomiarów pozwalających na ustalenie wartości stałej dysocjacji (SPR, MST). Podobnie analiza siły oddziaływań DnaA z wariantami DiaA wymagałaby weryfikacji metodami ilościowymi. Nie przekonuje mnie także jakość dokumentacji EMSA potwierdzającej wpływ DiaA na wiązanie DnaA do *oriC* w obecności S7P, opublikowanie tego manuskryptu będzie wymagało powtórzenia lub uzupełnienia tych badań. Ciekawym uzupełnieniem badań byłoby także zwiększenie ekspresji enzymów odpowiedzialnych za syntezę S7P w komórkach *E. coli* oraz zbadania efektu tej nadprodukcji na proces replikacji. **Proszę Doktorantkę o komentarz do powyższych wątpliwości i uwag.**

Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja, zarówno w omówieniu jak i w poszczególnych manuskryptach świadczy o świetnym przygotowaniu teoretycznym i bardzo dobrej znajomości literatury naukowej a także o zdolności do krytycznego spojrzenia na własne wyniki. Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę są w pełni uprawnione biorąc pod uwagę przeprowadzone badania eksperymentalne oraz dostępne dane literaturowe. Uważam, że błędem Doktorantki było włączenie do dysertacji preprintu 3, a za niepotrzebne uważam włączenie preprintu 4, gdzie udział Doktorantki był zbyt skromny. Pomijając jednak te dwie prace, na podstawie pracy pogładowej, pracy opublikowanej w *Sci. Data* oraz manuskryptu artykułu oryginalnego uważam, że dysertacja Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej jest bardzo wartościowa i wnosi nową wiedzę w zrozumieniu mechanizmów regulujących funkcjonowanie komórki bakteryjnej.

**Podsumowanie:**

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej uważam, że Doktorantka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną niezbędną dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne, wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej a przedstawiona do oceny dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia kryteria zawarte w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20.07 2018 r (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej do dalszych etapów postępowania.

Ze względu na umiejętne połączenie badań o charakterze przesiewowym oraz badań na poziomie pojedynczego enzymu z zastosowaniem metod proteomicznych, inżynierii genetycznej, oraz metod biochemicznych, podjęte ryzyko naukowe oraz uzyskanie cennych wyników z zakresu badań podstawowych wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium  
  
Prof. dr hab. Jerzy Dzięcielak

