



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”

Kluczowe procesy cyklu komórkowego, w szczególności powielanie materiału genetycznego, wymagają ścisłej kontroli oraz precyzyjnej koordynacji z tempem wzrostu komórki. W przypadku bakterii funkcjonujących w dynamicznie zmieniających się warunkach środowiskowych, zdolność do dostosowywania tempa wzrostu i podziałów komórkowych stanowi podstawowy warunek ich przetrwania oraz konkurencyjności ekologicznej. Replikacja DNA, jako proces wysoce energochłonny, musi być szczególnie precyzyjnie regulowana — zwłaszcza na etapie inicjacji — oraz ściśle sprzężona ze stanem metabolicznym komórki.

Pomimo wieloletnich badań nad mechanizmami kontroli replikacji DNA u bakterii, nadal niewiele wiadomo o procesach koordynujących tempo syntezy DNA z aktywnością metaboliczną komórki, szczególnie w warunkach zmiennego środowiska oraz w odpowiedzi na stres. Z tego względu problem badawczy podjęty w ocenianej rozprawie należy uznać za aktualny, istotny oraz dobrze uzasadniony naukowo.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelowego organizmu, jakim jest Gram-ujemna bakteria *Escherichia coli*, stanowiąca jeden z najlepiej poznanych systemów do analizy procesu replikacji DNA. Sformułowana przez Doktorantkę hipoteza badawcza zakłada, że białka zaangażowane w metabolizm oraz/lub drobnocząsteczkowe metabolity mogą — poprzez oddziaływanie z białkami uczestniczącymi w syntezie DNA — modulować ich aktywność, a tym samym uczestniczyć w koordynacji procesu replikacji DNA z tempem wzrostu komórki w określonych warunkach środowiskowych.

Forma ocenianej rozprawy doktorskiej ma charakter hybrydowy. Składa się z następujących części: wstępu, celu pracy, omówienia prac eksperymentalnych oraz wniosków i dyskusji. Do

rozprawy dołączono jeden opublikowany artykuł przeglądowy (Acta Biochimica Polonica), jeden opublikowany artykuł oryginalny (Scientific Data) oraz trzy preprinty/manuskrypty.

Doktorantka jest pierwszą autorką dwóch opublikowanych artykułów oraz jednego manuskryptu dostępnego na platformie bioRxiv. W pozostałych dwóch pracach jest jednym z szesnastu autorów (preprint w eLife) oraz jednym z dwóch równorzędnych pierwszych autorów manuskryptu (łącznie siedmiu autorów).

Udział Doktorantki w trzech artykułach/manuskryptach, w których jest jedyną pierwszą autorką, należy uznać za wiodący i znaczący, co zostało dodatkowo potwierdzone w oświadczeniach współautorów. W dwóch pozostałych manuskryptach jej wkład pozostaje związany z tematyką rozprawy doktorskiej, jednak nie ma charakteru wiodącego. W przypadku ostatniego manuskryptu, który – jak rozumiem – nie został jeszcze wysłany do druku, brak jest oświadczenia prof. dr hab. Anny Zawilak-Pawlik.

Prace opublikowane (w Acta Biochimica Polonica i Scientific Data) zostały już poddane procesowi recenzji, dlatego nie będą przedmiotem szczegółowej analizy w niniejszej recenzji.

W artykule opublikowanym w Scientific Data Doktorantka opracowała platformę do systemowego identyfikowania partnerów oddziałujących z białkami uczestniczącymi w procesie replikacji DNA oraz do analizy dynamiki interaktomu białek replikacyjnych w różnych warunkach wzrostu bakterii. Do identyfikacji interakcji białkowych wykorzystano chromatografię powinowactwa sprzężoną ze spektrometrią mas (AP-MS, affinity purification coupled with mass spectrometry). Jako „przynęty” wybrano osiem białek: DnaA, regulatory replikacji DiaA, Hda i SeqA, elementy replisomu — helikazę DnaB, prymazę DnaG, podjednostkę ψ polimerazy DNA III (Hold) oraz dodatkowo podjednostkę β reduktazy rybonukleotydowej (NrdB). Analiza MS wykazała, że około 36% wszystkich białek *E. coli* może potencjalnie wchodzić w interakcje z analizowanymi białkami.

Praca ta stała się punktem wyjścia do dalszych badań, których wyniki przedstawiono w trzech manuskryptach dołączonych do rozprawy doktorskiej. Spośród nich tylko jeden został poddany procesowi recenzji (eLife), jednak poprawiona wersja manuskryptu — mimo opublikowanych odpowiedzi na recenzje — nie ukazała się dotychczas w formie publikacji.

Moja główna uwaga dotyczy pracy zatytułowanej „Protein interaction network analysis reveals growth conditions-specific crosstalk between chromosomal DNA replication and other cellular processes in *E. coli*”, w której Doktorantka jest pierwszą autorką. Pomimo że praca ta jest dostępna w archiwum bioRxiv od 2021 roku, nie została dotychczas opublikowana w recenzowanym czasopiśmie i — jak można przypuszczać — najprawdopodobniej nie zostanie opublikowana w tej formie.

Zasadniczym problemem jest to, że pięć rycin zawartych w tej pracy (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 — obie części oraz Fig. S1) pojawia się również w artykule opublikowanym w Scientific Data (Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11, Fig. S4 oraz dane zdeponowane w projekcie NDEx).

Można zatem przypuszczać, że wersja pracy udostępnionej w bioRxiv stanowiła podstawę do przygotowania manuskryptu opublikowanego następnie w Scientific Data. Kwestia ta wymaga jednoznacznego wyjaśnienia i powinna zostać skomentowana przez Doktorantkę.

W pracy udostępnionej w archiwum bioRxiv, dołączonej do rozprawy doktorskiej, Doktorantka — poza danymi przedstawionymi w artykule w Scientific Data — podjęła próbę określenia biologicznego znaczenia wybranych powiązań w sieci interaktomu. Przeprowadziła ograniczoną analizę funkcjonalną wybranych dwóch genów, których produkty potencjalnie oddziałują z badanymi białkami replikacyjnymi. Analiza ta polegała na delecji genów: *rlmE* oraz *rfaB*, kodujących odpowiednio metylotransferazę 23S rRNA oraz 6-epimerazę ADP-L-glicero-D-mannoheptozy. Białka te zostały zidentyfikowane odpowiednio w interaktomie NrdB i SeqA. Doktorantka wykazała, że delecja tych genów wpływa na regulację procesu replikacji DNA w cyklu komórkowym.

Interesującym rozwinięciem wyników przedstawionych w artykule opublikowanym w Scientific Data jest wykazanie powiązań pomiędzy mechanizmami utrzymującymi homeostazę zewnętrznych powłok komórkowych a regulacją replikacji DNA. Wyniki te zostały przedstawione w pracy przesłanej do eLife, w której Doktorantka analizowała wpływ delecji genów *bam* na regulację procesu replikacji DNA w cyklu komórkowym. Geny te kodują białka tworzące kompleks BAM (*β -barrel assembly machinery*), odpowiedzialny za prawidłowe fałdowanie oraz wbudowywanie białek błonowych w błonę zewnętrzną *E. coli*.

W ostatnim manuskrypcie wykazano, że drobnocząsteczkowy metabolit metabolizmu pierwszorzędowego sedoheptulozo-7-fosforanu (S7P) poprzez oddziaływanie z DiaA reguluje proces inicjacji replikacji DNA. Doktorantka wprowadziła szereg mutacji w genie *diaA*, które zaburzały wiązanie S7P i wykazała, że szczepy takie mają podobny fenotyp do szczepu z delecją tego genu.

Doktorantka formułuje tezę, że aparat replikacyjny ulega dynamicznej reorganizacji i jest funkcjonalnie powiązany z innymi procesami komórkowymi, w tym metabolizmem RNA, biosyntezą błony komórkowej oraz odpowiedzią na stres. Praca ta wpisuje się w aktualny nurt badań systemowych nad organizacją procesów komórkowych i podejmuje istotny problem koordynacji replikacji DNA z fizjologią komórki bakteryjnej w zmiennych warunkach środowiskowych.

Na podkreślenie zasługuje dobrze zaprojektowany układ eksperymentalny obejmujący różne warunki wzrostu (pożywka bogata, minimalna, faza stacjonarna), co umożliwi biologicznie uzasadnione porównania. Uwzględnienie dwóch typów kontroli (szczep bez znacznika oraz szczep z losowo znakowanym białkiem), a także zastosowanie replik biologicznych i odpowiedniej analizy statystycznej (w tym korekty FDR) znacząco zwiększa wiarygodność uzyskanych danych. Istotnym elementem pracy jest również walidacja wewnętrzna podejścia poprzez odtworzenie znanych oddziaływań białkowych, takich jak kompleksy związane z polimerazą DNA III czy interakcje DnaB–DnaC oraz Hda–DnaN. Świadczy to o poprawności zastosowanej metodologii. Na uwagę zasługuje także włączenie analiz funkcjonalnych (aczkolwiek ograniczonych), w tym badań mutantów delecyjnych (*ΔrlmE*, *ΔrfaD*) oraz analiz cytometrycznych cyklu komórkowego, które stanowią cenne uzupełnienie danych proteomicznych i próbę powiązania obserwacji na poziomie sieciowym z fenotypem komórkowym.

Uwagi krytyczne:

1. Badania mają w dużej mierze charakter opisowy. Chociaż zidentyfikowano liczne potencjalne interakcje białkowe, nie przedstawiono przekonujących dowodów biochemicznych potwierdzających ich bezpośredni charakter ani mechanizm działania.

Autorzy sami wskazują na konieczność dalszych badań w tym zakresie. W konsekwencji znaczna część wniosków ma charakter hipotetyczny.

2. Brak niezależnej weryfikacji kluczowych interakcji. Dane opierają się głównie na analizach AP-MS, które nie pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie interakcji bezpośrednich od pośrednich. Nie zastosowano innych metod weryfikujących potencjalne oddziaływanie (np. koimmunoprecypitacji, testów dwuhybrydowych), co ogranicza wiarygodność nowych obserwacji.
3. Kolejnym istotnym problemem jest nadinterpretacja danych korelacyjnych. Współcyszczenie białek bywa interpretowane jako dowód ich funkcjonalnej interakcji, mimo braku bezpośredniego potwierdzenia eksperymentalnego *in vitro*. Dotyczy to zwłaszcza postulowanych powiązań pomiędzy aparatem replikacyjnym a procesami degradacji RNA.
4. Manuskrypt nr 3 jest napisany niespójnie i miejscami niezrozumiały. Dane nie są odpowiednio udokumentowane ze względu na brak udostępnionych plików wynikowych. To co znajduje się w repozytorium oraz to, co jest pod linkiem, nie stanowi właściwie udokumentowanych danych wynikowych, a jedynie tzw. Source Data dla figur. Brak jest pliku podsumowującego całość obróbki statystycznej; wykazane są jedynie białka istotnie wzbogacone. Standardem w proteomice jest publikowanie tabelarycznego kompletu danych wynikowych (a więc takich po obróbce statystycznej/wnioskowaniu jakościowym) w formie niezmodyfikowanej (output as is). Część danych została uzupełniona w manuskrypcie nr 2.
5. Istotnym ograniczeniem metodologicznym jest także niewystarczająca kontrola zanieczyszczeń. Obecność białek rybosomalnych, typowych dla analiz AP-MS, nie została w pełni uwzględniona, a część z nich interpretowana jest jako potencjalni partnerzy.
6. Zastrzeżenia budzi brak komplementacji mutantów delecyjnych ($\Delta rlmE$, $\Delta rfaD$). Nie można wykluczyć efektów polarnych wpływających na ekspresję genów sąsiadujących, co mogłoby podważać część wniosków, szczególnie dotyczących procesów replikacji DNA.

7. Białka uczestniczące w procesie replikacji DNA i jego regulacji mogą podlegać modyfikacjom posttranslacyjnym w trakcie cyklu komórkowego, co może wpływać na powinowactwo tych białek do zidentyfikowanych partnerów. Należało to uwzględnić w dyskusji przedstawionych wyników.
8. Zakres badania ograniczony jest do ośmiu białek replikacyjnych, co może prowadzić do niepełnego obrazu sieci oddziaływań. Ponadto walidacja funkcjonalna została przeprowadzona jedynie dla dwóch genów, co ogranicza możliwość uogólnienia wniosków.
9. Autorzy dokonali bardzo standardowych zabiegów obróbki danych mających na celu minimalizację wyników fałszywych. Przykładowo, sztywne przyjęcie wartości odcięcia fold-change: czasem lepsze wyniki można by uzyskać, stosując dynamiczny próg dla fold-change (otrzymany np. na podstawie rozkładu wartości fold-change — można wtedy przyjąć wartość dla określonego decyla wartości). Odcięcie białek po liczbie zidentyfikowanych unikatowych peptydów — w eksperymencie AP-MS wykluczenie białek zidentyfikowanych/skwantyfikowanych na podstawie tylko 1 unikatowego peptydu często pozwala znacznie lepiej odsiać białka nieswoiste.

Podsumowanie

Reasumując, do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy identyfikacja potencjalnych powiązań pomiędzy replikacją DNA a:

- metabolizmem i degradacją RNA (w tym degradosomem),
- biosyntezą otoczki komórkowej (np. LPS),
- metabolizmem centralnym.

Wyniki zawarte w rozprawie wspierają koncepcję systemowej integracji procesów regulujących replikację DNA oraz wskazują na znaczną plastyczność sieci oddziaływań białkowych w zależności od warunków środowiskowych.

W świetle powyższego, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej pt. „Powiązania między replikacją DNA a innymi procesami

komórkowymi *Escherichia coli* oraz ich rola w koordynacji bakteryjnego cyklu komórkowego” i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku o Jej dopuszczenie, stwierdzając jednocześnie, że praca spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce MNiSW.



Jolanta Zakrzewska