

Prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 02-106, Pawińskiego 5A

Warszawa, 2013-09-21

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej

pt. „Genetyczne podstawy współzależności pomiędzy regulacją replikacji DNA a centralnym metabolizmem węgla i alarmonami stresowymi w komórkach *Escherichia coli*”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz.

Rozprawa składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 5 artykułów naukowych. Dołączone są również oświadczenia współautorów opisujące zakres ich prac w poszczególnych publikacjach. Łączny Współczynnik cytowalności (ang. Impact factor) przedstawionych prac wynosi ~11. Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska jest pierwszym autorem we wszystkich dołączonych pracach.

Wszystkie artykuły naukowe stanowią jednolitą tematykę badawczą i dotyczą nowatorskich badań próbujących poznać zależności pomiędzy centralnym metabolizmem węgla, alarmonami stresowymi, a mechanizmami replikacji DNA w komórkach bakteryjnych. Poznanie takich zależności pozwoli na dogłębniejsze poznanie funkcjonowania komórki oraz rozszerzy naszą wiedzę o wpływie procesów metabolicznych na stabilność materiału genetycznego.

Pierwsza z prezentowanych prac opublikowana w *Microbial Cell Factories* w 2011 opisuje badania analogiczne do przeprowadzonych wcześniej w komórkach *Bacillus subtilis*. Celem pracy było zbadanie czy opisana wcześniej w komórkach bakterii Gram dodatnich zależność pomiędzy specyficznymi reakcjami metabolicznymi a procesem replikacji DNA jest zjawiskiem powszechnym, czy dotyczy również bakterii Gram ujemnych, na przykładzie modelowym *Escherichia*

coli. W tym celu do szczepów niosących mutacje w genach związanych z inicjacją czy elongacją procesu replikacji wprowadzono mutacje w genach ważnych dla szlaków glikolizy, glukoneogenezy, szlaku pentozofosforanowego, cyklu Krebsa czy szlaku pirogronianu. Skonstruowano imponującą listę szczepów niosących pojedyncze i podwójne mutacje. Mutacje w genach związanych z procesem replikacji nadawały komórkom fenotyp temperaturo-wrażliwości. Sprawdzano, która z mutacji (delecji) w genach centralnego metabolizmu węgla znosi temperaturo-wrażliwość badanych szczepów. Wykazano, że zarówno na etapie inicjacji, jak i elongacji inaktywacja pewnych genów kodujących produkty związane z metabolizmem węgla powoduje zniesienie efektu temperaturo-wrażliwości. Wyniki te, podobnie jak w bakteriiach *Bacillus subtilis* potwierdziły powiązanie pomiędzy procesem replikacji a centralnym metabolizmem węgla. W pracy tej Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska konstruowała szczepy bakteryjne, optymalizowała metodę badania supresji temperaturo-wrażliwości. Brała udział w wykonaniu części eksperymentów analizy supresji. Doktorantka wykonała pomiary czasu generacji poszczególnych szczepów bakteryjnych. Uczestniczyła w konstrukcji plazmidów niosących poszczególne geny związane z metabolizmem węgla. Ponadto brała udział w dyskusji wyników i współredagowaniu manuskryptu.

W następnej pracy, opublikowanej w *Mutation Research* w 2012 roku autorzy postanowili sprawdzić czy prawidłowe funkcjonowanie centralnego metabolizmu węgla ma wpływ na wierność procesu replikacji DNA w komórkach *E. coli*. W tym celu użyto dwa szczepy, niosące różne mutacje (*dnaX36* oraz *dnaQ49*) w genach związanych z kontrolą wierności replikacji DNA. Obecność tych mutacji w komórce powodowała fenotyp mutatorowy. Autorzy wykazali, że fenotyp ten jest suprymowany poprzez wprowadzenie delecji aż 13 genów związanych z centralnym metabolizmem węgla. Wkład Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej w powstanie tej pracy polegał na konstrukcji licznych szczepów bakteryjnych, współwykonaniu doświadczeń związanych z pomiarami częstości mutagenyzy w szczepach kontrolnych oraz w szczepach niosących dwa zmutowane geny, geny związane z replikacją i z centralnym metabolizmem węgla. Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska brała udział w dyskusji wyników i pisaniu manuskryptu.

W pracy opublikowanej w 2012 w *Gene*, kontynuowano podjętą tematykę i sprawdzono czy mutacje w genach związanych z centralnym metabolizmem węgla suprymują inny fenotyp mutantów replikacyjnych – filamentacje. Podobnie jak w we wcześniejszej pracy zaobserwowano supresję filamentacji i wykazano, że istnieje zależność pomiędzy fenotypem filamentacji, a prawidłowym przebiegiem centralnego metabolizmu węgla. W pracy tej Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska wykonywała analizy mikroskopowe umożliwiające pomiar długości komórki bakteryjnej w poszczególnych szczepach. Przeprowadziła analizę statystyczną otrzymanych wyników, brała udział w analizie i opracowaniu wyników dla potrzeb manuskryptu.

W kolejnej pracy opublikowanej w 2012 roku w *Plazmid* Doktorantka badała, jakie może być powiązanie alarmonów odpowiedzi ścisłej, odpowiedzi bakterii na stres związany z brakiem odpowiednich składników pokarmowych, z prawidłowym przebiegiem procesu replikacji. Analizując pomiary kinetyki syntezy starterów replikacji *in vitro* wykazano, że obecność czterofosforanu guanozyny (ppGpp) obniża wydajność syntezy starterów niezbędnych do replikacji. Wkład Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej w powstanie tej pracy polegał na oczyszczeniu białek DnaB i DnaG, ocenie wydajności syntezy primerów przez primazę *in vitro*. Doktorantka brała udział również w dyskusji wyników i współredagowała manuskrypt pracy naukowej.

Piąta praca opublikowana w *FEBS Open BIO* opisuje wyniki inhibicji replikacji DNA *in vitro* w obecności ppGpp. Prowadzone badania miały również na celu sprawdzenie czy obserwowana wcześniej w obecności ppGpp, inhibicja replikacji DNA i syntezy primerów przez primazę *in vitro* znajdzie potwierdzenie w hamowaniu syntezy *in vivo* w komórkach *E. coli* w warunkach ścisłej kontroli, gdy wewnątrzkomórkowe stężenie ppGpp wzrasta. Otrzymane wyniki wykazały brak korelacji pomiędzy wynikami *in vivo* i *in vitro*. Autorzy postulują, że działanie ppGpp na primazę *in vivo* nie jest tak bezpośrednie jak w układzie *in vitro* i że efekt ppGpp może być maskowany przez inne czynniki. Ponadto proponują, że istnieje kompetycja pomiędzy działaniem ppGpp na primazę i polimerazę RNA. Duża ilość cząsteczek Pol RNA może wysycić ppGpp obecne w komórkach. Innym czynnikiem różnicującym doświadczenia *in vivo* i *in vitro* może być stężenie ppGpp. Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska w powyższej publikacji wykonywała badania replikacji *in*

vitro i *in vivo*, brała udział w przedyskutowywaniu wyników i współredagowaniu manuskryptu.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić doktorantkę o przedyskutowanie kilku zagadnień.

1. Czy istnieje korelacja pomiędzy użytymi mutantami replikacyjnymi i mutantami związanymi z centralnym metabolizmem węgla, a różnymi badanymi fenotypami ?

2. Czy w ocenie Doktorantki zmiany poziomu mutagenyzy spontanicznej w szczepach z zaburzoną wiernością replikacji DNA, spowodowane delecjami poszczególnych genów centralnego metabolizmu węgla mogą wynikać ze zmian w aktywności poreplikacyjnego systemu reperacji błędnie sparowanych zasad, który jest bardzo ważnym etapem korekcji błędów replikacyjnych? Czy pomiary poziomu mutagenyzy były też prowadzone w szczepach z nieaktywnym systemem naprawy błędnie sparowanych zasad? Czy według Doktorantki obserwowana jest korelacja pomiędzy pomiarami mutagenyzy otrzymanymi dla dwóch genów markerowych (*rpoB* i *gyrB*) w poszczególnych szczepach użytych w publikacji?

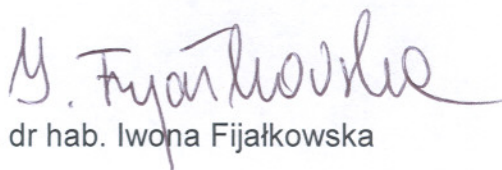
3. W każdej z prezentowanych prac proponowano pewne mechanizmy tłumaczące powiązania pomiędzy centralnym mechanizmem węgla, alarmonami stresowymi a replikacją DNA. Prosiłabym o podsumowanie powiązań pomiędzy tymi procesami, na podstawie wyników Doktorantki oraz na podstawie innych wyników sugerujących takie powiązania w różnych badanych organizmach tj. np. bakterie, bakteriofagi czy u ludzi.

Podsumowując recenzent stwierdza, że prezentowane w pracy doktorskiej wyniki i ich interpretacja są wystarczającym materiałem dla uzyskania stopnia doktora nauk przyrodniczych. Oświadczenia autorów pokazały, że wkład Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej w powstanie 5 prac przedstawionych w rozprawie doktorskiej był wiodący i znaczący. Dodatkowym argumentem jest fakt, iż doktorantka jest pierwszym autorem w tych publikacjach.

W mojej ocenie Pani mgr Monika Maciąg-Dorszyńska uzyskała bardzo ciekawe wyniki o interesującej wartości naukowej. Otrzymane wyniki z pewnością są

doskonałym materiałem wyjściowym dla dalszych badań powiązań centralnego metabolizmu węgla i replikacji DNA nie tylko w komórkach bakteryjnych, ale również w innych organizmach. Przy jej realizacji Doktorantka wykazała się umiejętnością wytyczania ważnych celów badawczych i umiejętnością ich konsekwentnej realizacji. Trzeba podkreślić, że otrzymane wyniki zostały opublikowane w kilku pracach, w renomowanych czasopismach naukowych. Warto wspomnieć, że Pani Monika Maciąg-Dorszyńska jest również współautorem pracy przeglądowej opublikowanej w 2013 roku *Microbial Cell Factories*. Praca ta nie została włączona do rozprawy doktorskiej, ale dotyczy również roli centralnego metabolizmu węgla w kontroli replikacji DNA.

Uważam, że opisany udział Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej w powstanie pięciu prac naukowych zaprezentowanych do recenzji upoważnia mnie do stwierdzenia, że rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie przez autora zagadnienia naukowego, wykazuje jego ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Maciąg-Dorszyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Chciałabym również prosić Radę Naukową Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie tej pracy. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, składająca się z pięciu prac naukowych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, prezentuje ogrom wykonanej pracy, jest interesującą rozprawą pod względem badawczym i w pełni zasługuje na wyróżnienie.



Prof. dr hab. Iwona Fijałkowska