

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 13.05.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Łukasza Makowskiego
„Charakterystyka procesu replikacji chromosomu u drapieżnej bakterii
***Bdellovibrio bacteriovorus*”**

Poznanie mechanizmów podstawowych procesów życiowych odbywa się zazwyczaj z wykorzystaniem organizmów modelowych, łatwych do manipulacji w warunkach laboratoryjnych. Takimi organizmami są bakterie o dobrze poznanej genetyce i możliwościach bioinżynierii. Jednakże, prawdziwym wyzwaniem są badania organizmów o nietypowych sposobach rozwoju. Badania te, często trudne i pionierskie, przynoszą w rezultacie bardzo ważne i przełomowe odkrycia zmieniające niekiedy dotychczas ustalone schematy. Proces replikacji DNA wydawałby się bardzo dobrze poznany dzięki badaniom na wielu modelach bakteryjnych i eukariotycznych, także w zakresie regulacji powielania materiału genetycznego i dopasowania czasu replikacji do stanu fizjologicznego organizmu. Aczkolwiek badania nad mało znanymi do tej pory organizmami przynoszą nadal nowe zaskakujące odkrycia będące ważnym etapem w poznawaniu podstawowych procesów życiowych oraz interakcji między organizmami. Do takich badań należą prowadzone od wielu lat w zespole Pani prof. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej analizy mechanizmów regulacji replikacji u nietypowych mikroorganizmów. Badania te wykorzystują szerokie możliwości techniczne, zaplecze i umiejętności rozwijane w zespole Pani Profesor zarówno w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk

we Wrocławiu, jak i na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Z tych szerokich możliwości skorzystał doktorant, Pan Łukasz Makowski, pracując nad swoją rozprawą doktorską w zespole Prof. Zakrzewskiej-Czerwińskiej. Co w rezultacie przyniosło bardzo interesujące i cenne odkrycia zaprezentowane w ocenianej pracy.

Celem pracy mgr Makowskiego było scharakteryzowanie procesu replikacji bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus*. Bakteria ta ma nietypowy cykl życiowy, gdzie kluczowym etapem jest rozwój w komórce gospodarza - innej bakterii Gram-ujemnej. Ten niezwykle jak na bakterie, pasożytniczy sposób rozmnażania, jest interesujący dla badań podstawowych, jak również dla potencjalnego zastosowania tego organizmu w zwalczaniu bakterii patogennych. Dlatego wybór modelu badawczego był bardzo istotny dla badań Doktoranta, w związku z czym jego prace są istotnym elementem współczesnych nurtów badań naukowych. Rozprawa składa się z trzech wieloautorskich publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych, wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, oraz wprowadzeniem do przedstawianej tematyki. Taka prezentacja rozprawy doktorskiej jest zgodna z wymogami określonymi w ustawie z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki. W myśl tej ustawy, rozprawa doktorska może stanowić wyodrębnioną część pracy zbiorowej pod warunkiem wykazania odpowiedniego wkładu kandydata w opracowanie założeń pracy, wykonaniu prac eksperymentalnych, opracowaniu wyników i odpowiedniej ich prezentacji. Dla tego celu zostały przedstawione oświadczenia współautorów publikacji wraz z opisem wkładu Doktoranta w realizację prac. Oświadczenia te wyraźnie wskazują, iż Doktorant pełnił istotną rolę w każdej z tych publikacji - w związku z czym mogę stwierdzić, że wymogi formalne zawarte w ustawie zostały spełnione.

Na rozprawę składają się dwie prace eksperymentalne i jedna przeglądowa. Prace eksperymentalne zostały opublikowane w *Frontiers of Microbiology* i *Applied Environmental Microbiology*, które są uznanymi czasopismami z zakresu mikrobiologii, o dużym znaczeniu i zasięgu. W pracach tych Pan mgr Makowski jest pierwszym autorem a jego udział w powstaniu publikacji wynosi, na podstawie oświadczeń, odpowiednio 70 i 55%. W pracach tych Doktorant zaplanował, wykonał i przeanalizował przeważającą część eksperymentów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, brał też udział w przygotowywaniu manuskryptów publikacji wraz z Promotorem rozprawy. Trzecia publikacja to praca przeglądowa, która ukazała się w polskojęzycznym czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. W tej pracy udział Doktoranta został

określony na 80%. Opublikowanie wyników pracy doktorskiej wskazuje też, iż rezultaty badań zostały już krytycznie ocenione przez ekspertów oraz iż zostały udostępnione szerokiemu kręgowi naukowemu - świadczy to o znaczeniu prezentowanych badań.

Prace eksperymentalne przedstawiają ciekawy zestaw wyników opartych na świetnie dobranej metodologii. W pracy wykorzystane zostały m.in. nowoczesne techniki przyżyciowego obrazowania mikroskopowego w czasie rzeczywistym, co pozwoliło na precyzyjne określenie umiejscowienia i dynamiki chromosomów *B. bacteriovorus* podczas replikacji DNA i procesów prowadzących do powstania komórek potomnych. Z uwagi na bardzo ograniczoną wiedzę na temat mechanizmów powielania materiału genetycznego tej nietypowej bakterii, pierwszym zadaniem było określenie podstawowych parametrów i czynników uczestniczących w tym procesie. Metodami zarówno *in silico* jak i *in vitro* i *in vivo* zostały wyznaczone miejsca startu replikacji (origin) jak i rejon odpowiadający za rozwijanie podwójnej nici DNA. Scharakteryzowane zostało białko inicjatorowe DnaA oraz jego oddziaływanie z rejonem origin, jak również możliwość wiązania odpowiednich białek DnaA z komórek gospodarzy. Te informacje stały się podstawą do drugiej części badań, która miała odpowiedzieć na pytanie o liczbę, położenie i dynamikę replisomów w komórkach *B. bacteriovorus*. Zastosowanie znakowanych fluorescencyjnie białek: elementu maszynerii replikacyjnej DnaN i białka cytoplazmatycznego PilZ umożliwiły określenie położenia samej bakterii w czasie rozwoju w komórce *E. coli* jak i uwidocznienie miejsc działania kompleksu polimerazy DNA. Specyficzny rozwój drapieżnej bakterii wewnątrz zmodyfikowanej komórki gospodarza dotyczy także rozdzielenia w czasie procesu powielenia DNA i późniejszego podziału komórki - początkowo formuje się długi filament zawierający kilka replisomów i następnie kilka kopii chromosomu bakteryjnego. Septacja jest skorelowana z lizą komórki gospodarza. Badania umożliwiły obserwację kolejnych etapów rozwoju uwolnionych bakterii potomnych - co ciekawe, czas ataku kolejnych komórek ofiary przez *B. bacteriovorus* zależy od wielu czynników, m.in. gęstości komórek gospodarza. Wyniki badań przedstawionych w tych dwóch pracach dokładnie opisują mechanizmy replikacji i rozwoju *B. bacteriovorus* i stanowią ważny wkład w badania nad tą pasożytniczą bakterią. Praca przeglądowa opisuje cykl życiowy *B. bacteriovorus* oraz podobnych do niej bakterii, stanowiąc interesujące podsumowanie dotychczasowej wiedzy, wskazuje ona na dogłębną wiedzę Doktoranta w tematyce rozwoju i potencjalnego zastosowania tych bakterii.

Jak w większości projektów naukowych, także i tu, dotychczas uzyskane wyniki generują kolejne pytania i otwierają nowe możliwości badawcze. W związku z tym chciałam zadać kilka pytań dotyczących interpretacji i implikacji rezultatów badań:

1. Jaki wpływ mają sygnały quorum sensing komórek ofiary na fazę wzrostu i rozwoju *B. bacteriovorus*?
2. Czy została scharakteryzowana odpowiedź ścisła u *B. bacteriovorus* oraz jej potencjalna rola w procesie rozwoju bakterii w komórce gospodarza i wyborze cyklu życiowego, szczególnie w świetle informacji o rozpoznawaniu stanu komórki ofiary i możliwości dopasowywania się do niej poprzez wybór odpowiedniej drogi rozwoju?
3. Jakie są potencjalne zagrożenia i sposoby ich zapobiegania w potencjalnej terapii z zastosowaniem *B. bacteriovorus* - z uwagi na szeroki zakres gospodarzy?
4. Jak odbywa się atak na komórkę ofiary w przypadku komórek *B. bacteriovorus*, które nie dokończyły cyklu życiowego i potrzebują w tym celu nowej ofiary?

Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera zestaw oryginalnych, bardzo ciekawych i dobrze przeprowadzonych badań, wyjaśniających mechanizmy replikacji i rozwoju pasożytniczej bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus*. Należy podkreślić wysoki poziom nowatorstwa badań wynikający zarówno z tematyki jak i zastosowanej metodologii. Pracę oceniam bardzo wysoko z uwagi na jej wkład w zrozumienie podstawowych procesów życiowych u mało poznanej i bardzo interesującej bakterii. Podsumowując, mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, iż rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Makowskiego spełnia wszystkie wymagania zawarte w ustawie. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu do dopuszczenia Pana mgr Łukasza Makowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na znaczenie naukowe oraz nowatorstwo prezentowanej rozprawy składam wniosek o nagrodzenie jej stosownym wyróżnieniem.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
KIEROWNIK
Katedry Genetyki Molekularnej Bakterii

prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz