

**Prof. dr hab. Anna Skorupska**  
Prof. emerytowany  
Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin

Lublin, 13. 05. 2019 r.

### **Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Makowskiego**

#### **p.t. „Charakterystyka procesu replikacji chromosomu u drapieżnej bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus*”**

*Bdellovibrio bacteriovorus* jest bakterią charakteryzującą się niezwykle, drapieżnym stylem życia i związanym z tym unikalnym cyklem rozwojowym, którego najważniejszym etapem jest proces replikacji genomu. Warunkiem wzrostu i namnażania się tych bakterii jest obecność w środowisku innych bakterii, które są celem ataku. Ze względu na to, że drapieżcy atakują różne gatunki bakterii patogennych, obok bakterii saprofitycznych, obserwuje się duże zainteresowanie praktycznym zastosowaniem *B. bacteriovorus*. Daje to nadzieję na wykorzystanie tych bakterii jako „naturalnych antybiotyków” w walce z zakażeniami bakteryjnymi. Są już opublikowane różne przykłady wykorzystania *B. bacteriovorus* w przemyśle, weterynarii i medycynie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Łukasza Makowskiego została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie oryginalne współautorskie prace opublikowane w wysoko notowanych czasopismach z bazy JCR: (1) *Initiation of chromosomal replication in predatory bacterium Bdellovibrio bacteriovorus*. Front. Microbiol., 2016, 7:1898, w której mgr Ł. Makowski jest pierwszym autorem, z 70% deklarowanym udziałem w wykonaniu i napisaniu pracy. (2) *Dynamics of chromosome replication and its relationship to predatory attack lifestyles in Bdellovibrio bacteriovorus*. Appl Environ Microbiol. 2019 (zaakceptowana do druku), w której Doktorant deklaruje 55% wkład własny. Obok prac oryginalnych w skład rozprawy wchodzi także dwuautorska praca przeglądowa p.t. *Cykl życiowy drapieżnej bakterii Bdellovibrio bacteriovorus*. Postępy Hig Med Dośw, 2018, w wykonaniu której, wkład Doktoranta wynosił

80%. Udział pozostałych autorów afiliowanych w różnych jednostkach naukowych (także zagranicznych) został przedstawiony w odrębnych oświadczeniach podpisanych przez współautorów i wskazujących na dominującą rolę mgr Makowskiego w wykonaniu i opracowaniu rozprawy. Dodatkowo, autor opracował (*co bardzo sobie cenię!*) kilkunastostronicowe, dobrze napisane **Wprowadzenie** do rozprawy zawierające opis etapów bakteryjnego drapieżnictwa, przebiegu własnych badań nad replikacją DNA *B. bacteriovorus* i uzyskanych wyników.

W skład całego dorobku naukowego Doktoranta wchodzi także współautorska publikacja w wysoko punktowanym czasopiśmie: Donczew R., Makowski Ł. i in. *The atypical response regulator HP1021 controls formation of the Helicobacter pylori replication initiation complex*. Mol Micro, 2014. Badania były finansowane m.in. z programów NCN Maestro i Erasmus.

Modelem badawczym w przedstawionej rozprawie jest *Bdellovibrio bacteriovorus*, Gram-ujemna bakteria, pasożytująca na saprofitycznych i patogennych bakteriach tej samej grupy. Jej niezwykle proces rozmnażania składa się z dwóch etapów: ataku, w którym bakterie nie dzielą się i bardzo intensywnie szukają ofiary. Po osiągnięciu celu, czyli inwazji do peryplazmy komórki ofiary, przechodzą w fazę wzrostu tworząc długi filament, w którym zachodzi replikacja genomu drapieżcy, synteza sept podziałowych i tworzenie kilku (od 2- do 9) komórek potomnych, które uwalniają się do środowiska i są zdolne do kolejnych ataków po osiągnięciu przez komórki odpowiedniej wielkości. Powstawanie potomnych komórek *B. bacteriovorus* jest równoczesne z rozpadem komórki ofiary spowodowanej intensywną degradacją makrocząsteczek ofiary (DNA, białek, peptydoglikanu). Cały cykl rozwojowy *B. bacteriovorus* trwa ponad 3 godz.

Celem badań Doktoranta przedstawionych w pierwszej oryginalnej publikacji były, nieopisane do tej pory, badania molekularne inicjacji replikacji *B. bacteriovorus*. Główne osiągnięcia Doktoranta w tym etapie pracy, to analiza *in silico* fragmentu genomu, gdzie zidentyfikowano region *oriC*, w którym rozpoczyna się replikacja genomu. Ten region, podobnie jak w innych bakteriach, zlokalizowano między genami *dnaA* i *dnaN*. W tym regionie zidentyfikowano również osiem miejsc wiązania się białka inicjatorowego DnaA do tzw. boksów DnaA oraz miejsce rozplatania DNA tzw. DUE (DNA unwinding element). W kolejnych analizach tego regionu z użyciem zaawansowanych metod *in vitro* i *in vivo* potwierdzono swoiste wiązanie białka DnaA do wszystkich miejsc wiązania w regionie *oriC* z utworzeniem jednego dużego kompleksu. Co ciekawe, stwierdzono, że białka DnaA izolowane z *E. coli* i *P. putida* wiążą się do DnaA boksów w sposób odmienny (taki jak w ich macierzystej komórce), a homologiczne wiązanie BdDnaA do DnaA boksów BdoriC jest słabsze niż w przypadku heterologicznego wiązania. Zmapowano również miejsce inicjacji

replikacji w regionie DUE. Podsumowując, opisano po raz pierwszy cały funkcjonalny region inicjacji replikacji DNA w komórkach *Bdellovibrio bacteriovorus*.

Następnym etapem replikacji genomu jest synteza potomnych nici DNA z udziałem DNA polimerazy III i innych białek tworzących replisom. Celem kolejnych badań Doktoranta było zbadanie dynamiki (choreografii) replikacji chromosomu pojedynczej komórki *B. bacteriovorus* w czasie rzeczywistym w mikroskopii fluorescencyjnej (TLFM). Znakując odrębnymi barwnikami fluorescencyjnymi białka komórkowe *B. bacteriovorus* i DNA, śledzono pozycję replisomów w komórce i ich dynamikę przestrzenną podczas całego cyklu rozwojowego. Tą techniką ustalono miejsce i czas rozpoczęcia replikacji w tzw. biegunie inwazyjnym, po 74 min od wejścia drapieżcy do peryplazmy ofiary, którą był szczep *E. coli*. Po zakończonej replikacji wszystkich replisomów tworzą się septy komórkowe oddzielające odrębne replisomy (od 2 do 9) zlokalizowane w rosnącym filamencie. W tym czasie w wyniku działania licznych enzymów proteolitycznych, komórka ofiary ulega degradacji i uwalniają się dojrzałe komórki potomne drapieżcy zdolne do kolejnych ataków na ofiary, po osiągnięciu odpowiedniej wielkości. W tych badaniach opisano również szereg innych zjawisk jak np. możliwość szybkiego ataku nowo powstałych komórek *B. bacteriovorus* na komórki ofiary ze znacznie skróconą fazą ataku i inicjacji replikacji. Inną obserwacją jest możliwość wykorzystania przez drapieżcę drugiej komórki ofiary dla zakończenia cyklu rozwojowego w przypadku niekompletnego (abortywnego) przebiegu tworzenia potomnych replisomów.

W dyskusji Doktorant podkreślił szereg elementów cyklu rozwojowego *B. bacteriovorus*, które wymagają dalszych badań, takich jak opisanie sygnałów regulatorowych, jakie przypuszczalnie istnieją na etapach rozpoznania ofiary i rozpoczęcia inwazji, czy też na etapie tranzycji od fazy ataku do fazy replikacji chromosomu. Nieznane są także sygnały koordynujące replikację chromosomu z progresją cyklu komórkowego *B. bacteriovorus*. Podsumowując, Doktorant przedstawił pełny cykl życiowy drapieżnej bakterii wyznaczając dokładny czas i miejsce poszczególnych etapów ataku i replikacji chromosomów prowadzących do powstania dojrzałych komórek potomnych. Co więcej, na dołączonych filmach można zobaczyć całą choreografię cyklu życiowego tej bakterii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wykonanie i przedstawienie czytelnikom w opublikowanych pracach, pięknych, czytelnych dla odbiorców, rycin, tabel i filmów ilustrujących dynamikę całego cyklu życiowego drapieżnej bakterii. Opracowanie tego materiału niewątpliwie wymagało wiele pracy, lecz również podkreślało najważniejsze osiągnięcia zespołu.

Na rozprawę doktorską mgr Ł. Makowskiego składa się także praca przeglądowa, w której opisano poszczególne etapy cyklu rozwojowego drapieżnej bakterii *B. bacteriovorus* przybliżając ten unikalny, wśród bakterii, proces szerokiemu grzmiem czytelników. Co ciekawe, cykl rozwojowy tej bakterii nie jest obligatoryjnie związany z komórką ofiary.

Opisano także cykl rozwojowy niezależny od komórek gospodarza, pod warunkiem dostępności w podłożu aminokwasów i kofaktorów. Przyczyną wejścia w taki cykl jest mutacja w genie odpowiedzialnym za tworzenie pilusa typu IVb niezbędnego w cyklu komórkowym *B. bacteriovorus*.

Ze strony recenzenta jest pytanie, w jakim stopniu pilus decyduje o swoistym rozpoznawaniu ofiary w fazie ataku? Z tych informacji wynika, że swoistość tej bakterii jest niska, ponieważ bakteria może zakażać różne gatunki bakterii, w tym własną komórkę.

W tej publikacji opisano również inne bakterie należące do grupy BALO, takie jak *Halobacteriovorax marinus* i *Bdellovibrio exovorus* o nieco odmiennych cyklach rozwojowych.

Przedstawioną do oceny opublikowaną rozprawę doktorską mgr Ł. Makowskiego oceniam bardzo dobrze. Nie mam uwag merytorycznych do przedstawionych prac. Jediną uwagą jest przypomnienie, że zawsze nazwy bakterii piszemy italikiem (patrz Literatura w polskiej części rozprawy).

Na potrzeby dyskusji chciałabym zapytać;

- co przeszkadza w wykorzystaniu *B. bacteriovorus* jako „naturalnych antybiotyków” w medycynie?
- czy produkty degradacji komórek ofiar, takich jak *E. coli*, czy *Salmonella* sp. mogą być przyczyną wykluczającą wykorzystanie drapieżnych bakterii w medycynie?
- co było największym problemem w pracy z taką unikalną bakterią?
- jakie są plany Doktoranta w dalszej aktywności naukowej?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Łukasza Makowskiego prezentuje wysoki poziom naukowy i szeroką wiedzę Doktoranta. Przedstawiono bardzo interesujące wyniki badań uzyskane z zastosowaniem wielu nowatorskich metod i technik molekularnych, które pozwoliły na opisanie po raz pierwszy całego cyklu życiowego drapieżnej bakterii *Bdellovibrio bacteriovorans*. Jego dotychczasowe badania zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych..

W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach i tytule naukowym z dnia 14. marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Dotychczasowy, opublikowany dorobek naukowy przedstawiony w rozprawie doktorskiej w pełni uzasadnia wnioski o nadanie mgr Łukaszowi Makowskiemu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

**Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Makowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przyjęcie rozprawy doktorskiej.**

Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość naukową, oryginalność i znaczenie poznawcze pracy, składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Anna Skorupska