



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ
BIOLOGII

UNIWERSYTET GDAŃSKI

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

Gdańsk, 22.04.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana magistra Damiana Trojanowskiego

„Analiza dynamiki replisomów w trakcie cyklu komórkowego *Mycobacterium smegmatis*”

Replikacja DNA stanowi jeden z najbardziej podstawowych procesów życiowych każdego organizmu, niezbędny dla przetrwania organizmów i utrzymania gatunków. Główne założenia i etapy tego procesu są wspólne dla wszystkich znanych organizmów, zaś obserwowane różnice dotyczą najczęściej budowy czy specyficzności enzymów uczestniczących w procesie replikacji. Z uwagi na istotność tego procesu dla funkcjonowania świata żywego, badania nad nim prowadzone są od lat, z wykorzystaniem pozornie mniej skomplikowanych modeli organizmów jednokomórkowych, głównie bakterii. Dodatkową przyczyną prowadzenia tych badań na modelach bakteryjnych są korzyści, jakie niesie poznanie podstawowych procesów życiowych u bakterii patogennych. Poszukiwania nowych możliwości zwalczania zakażeń bakteriami chorobotwórczymi jest szczególnie ważne obecnie przy dramatycznie wzrastającej antybiotykooporności mikroorganizmów i coraz większych problemów z prowadzeniem efektywnej terapii. Dlatego szczegółowe poznanie procesów niezbędnych dla utrzymania populacji tych bakterii umożliwia zaplanowanie i zastosowanie terapii kierowanej specyficznie przeciwko określonym chorobotwórczym mikroorganizmom. I tak, maszyna replikacyjna jest potencjalnie bardzo dobrym celem działania substancji antibakteryjnych, jednakże tylko wtedy, jeśli dana substancja będzie oddziaływać jedynie na enzymy bakteryjne.

Stąd, konieczność precyzyjnego scharakteryzowania działania i specyfiki replikacji w komórkach bakteryjnych. W nurt tych badań wpisuje się tematyka przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr Damiana Trojanowskiego. W rozprawie tej przedmiotem badań jest replikacja bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Rodzaj ten znany jest ze swoich patogennych przedstawicieli, takich jak *Mycobacterium tuberculosis* czy *Mycobacterium leprae*, powodujących zagrażające życiu choroby o dużym ciężarze społecznym. Badania nad tym rodzajem prowadzone są typowo na modelu niepatogennej i stosunkowo szybko rosnącej bakterii, *Mycobacterium smegmatis*, i tak było również w niniejszej pracy doktorskiej. Rozprawa została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem Pani profesor Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. W zespole Pani Profesor od lat prowadzone są badania nad mechanizmami regulacji replikacji u organizmów bakteryjnych. W przedstawionej do recenzji rozprawie wyraźnie jest widoczne, iż Doktorant skorzystał wszechstronnie z możliwości pracy w świetnym zespole o światowej renomie oraz potencjału technicznych i aparaturowego Zakładu, a przede wszystkim z wiedzy i doświadczenia naukowego Promotora rozprawy.

Celem pracy doktorskiej Pana Damiana Trojanowskiego było scharakteryzowanie dynamiki replikacji chromosomu bakterii *Mycobacterium smegmatis*, co ilustruje tytuł rozprawy. Doktorant ubiega się o stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Rozprawa została przedstawiona w postaci zbioru trzech wieloautorskich publikacji, wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, oraz wprowadzeniem do tematyki rozprawy. Jest to zgodne z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki, zgodnie z którą rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, odpowiadający warunkom określonym w ustawie. W związku z tym do rozprawy dołączono oświadczenia o udziale procentowym poszczególnych współautorów prac, oraz szczegółowy opis wkładu Doktoranta w realizację prac. Na podstawie nadesłanych materiałów mogę stwierdzić, iż rozprawa spełnia wymogi formalne zawarte w ustawie.

Składające się na rozprawę publikacje to dwie prace eksperymentalne i jedna przeglądowa. Obie prace doświadczałne zostały opublikowane w wysoko punktowanych,

renomowanych czasopismach, mBio i Scientific Reports (IF 6.975 i 5.525, odpowiednio), aczkolwiek należy wspomnieć, iż ASM, do którego należy mBio, usunął informacje o współczynniku wpływu ze swoich stron informacyjnych wskazując na nieprzydatność i niemiarodajność tego rodzaju punktacji. Niemniej jednak wartość i zasięg naukowy tych czasopism, niezależnie od ich punktacji, są niewątpliwe. W obu publikacjach Pan mgr Trojanowski jest pierwszym autorem, a jego udział procentowy to 60 i 70%. W obydwóch pracach Doktorant wykonał przeważającą część eksperymentów, w tym konstrukcję i weryfikację szczepów, wykonanie analiz mikroskopowych, analizował także uzyskane wyniki oraz wraz z Promotorem rozprawy przygotowywał manuskrypty prac. Wskazuje to jednoznacznie na wiodący udział Doktoranta w powstaniu tych prac. Trzecia publikacja, składająca się na rozprawę doktorską, to praca przeglądowa opublikowana, w języku polskim, w czasopiśmie Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. W pracy tej udział doktoranta, przedstawiony odpowiednim oświadczeniem, wyniósł 35%.

Przedstawienie rozprawy w postaci zbioru publikacji oznacza także, iż prezentowane w niej wyniki przeszły już ścisły i krytyczny proces recenzji, a zaakceptowanie ich do druku w prestiżowych czasopismach świadczy o ich znaczeniu naukowym.

Wartość merytoryczna niniejszej rozprawy leży w metodycznym, dobrze przygotowanym i zrealizowanym projekcie zbadania dynamiki zmian w kompleksie replikacyjnym i segregacyjnym *M. smegmatis*, także w kontekście przestrzennym w komórce. Zastosowanie znakowanych komponentów maszynarii replikacyjnej pozwoliło na obserwację i wyciągnięcie wniosków dotyczących lokalizacji replisomów, długości trwania odpowiednich faz cyklu komórkowego i segregacji rejonu *oriC*, zachodzącym przy udziale białka ParB wkrótce po inicjacji replikacji. Ponadto, eksperymenty z udziałem nadprodukcji białka segregacyjnego ParB wskazują na jego rolę w ogólnej organizacji chromosomu. Wykazanie przy udziale analizy mikroskopowej w czasie rzeczywistym dynamiki replisomów i widełek replikacyjnych u *M. smegmatis* uważam za bardzo istotne osiągnięcie tej pracy.

Bardzo interesujące dane zostały uzyskane (i przedstawione w drugiej publikacji) w badaniach nad synchronizacją inicjacji replikacji chromosomu *M. smegmatis*, replikacji i podziału na komórki potomne. U szybko rosnących bakterii, jak *E. coli*, typowe jest inicjowanie nowej rundy replikacji przed podziałem komórki, tak że komórka potomna dziedziczy częściowo już zreplikowany chromosom. Dzieje się tak zwłaszcza w warunkach optymalnych pod

względem temperatury i dostępności pokarmu. Jednakże, u wolno rosnących bakterii jak *Mycobacterium* takie zjawisko nie było dotychczas opisywane. Dlatego za wyjątkowo interesujące uważam wyniki pokazujące proces reinicjacji replikacji w części populacji dzielących się komórek *M. smegmatis*. Co ciekawe, proces ten zachodzi najczęściej u jednej z dwóch komórek potomnych, a nie u obydwóch. Taka heterogenność prowadzi do zadania pytania, czy u jej podstaw są zmiany genetyczne, epigenetyczne, czy dzieje się to przypadkowo. Czy możliwe byłoby zatem podjęcie próby zbadania, czy komórka, w której zaobserwowano ten fenomen, będzie utrzymywać zwiększoną częstość reinicjacji oraz czy u podłoża tego zjawiska mogą być zmiany możliwe do szczegółowych analiz. Pojawianie się takich komórek także w niesprzyjających warunkach wzrostu odróżnia ten fenomen od obserwacji prowadzonych dla *E. coli*. Poprosiłabym, aby Doktorant przedyskutował szerzej możliwe korzyści, jakie bakterie *M. smegmatis* odnoszą z pojawiania się w określonej częstości takich komórek w populacji. Ponadto, chciałabym zapytać, jaką rolę w tym zjawisku mógłby pełnić alarmon odpowiedzi ścisłej, czterosfosforan guanozyny (ppGpp).

O naukowej wartości pracy zdecydował także warsztat badawczy zastosowany do osiągnięcia celów rozprawy. Poza klasycznymi metodami biologii molekularnej i mikrobiologii, użytych dla konstrukcji i testowania szczepów, zastosowane zostały najnowocześniejsze techniki obrazowania mikroskopowego, z wykorzystaniem możliwości fluorescencyjnej mikroskopii mikroprzepływowej. Ta technika pozwala na przyżyciowe obrazowanie w czasie rzeczywistym zmian zachodzących na poziomie jednej komórki. Badania typu *single cell* stają się obecnie najbardziej cenionym podejściem eksperymentalnym i dostarczają znacznie bardziej precyzyjnych informacji, niż stosowane klasycznie metody badania całej populacji (hodowli) bakteryjnej. Podejście to wymagało skonstruowania zestawu szczepów z znakowanymi fluorescencyjnie białkami replikacyjnymi i segregacyjnymi, dzięki czemu możliwa była nie tylko obserwacja położenia przestrzennego replisomu i segrosomu, ale także wyznaczenie czasu trwania poszczególnych faz wzrostu bakterii.

Trzecia włączona do rozprawy publikacja stanowi nawiązanie do możliwości zastosowania wyników uzyskiwanych podczas badań podstawowych dla poszukiwań nowych celów dla terapii antybakteryjnej, szczególnie w odniesieniu do lekoopornych szczepów. Obszarem poszukiwań nowych tarcz terapeutycznych mogą być białka zaangażowane w replikację DNA, na etapie syntezy, rozplatania nici czy zmian topologicznych. W publikacji

przedstawione zostały możliwości wysokoprzepustowego podejścia do poszukiwań takich substancji, umożliwiające jednoczesne i wydajne testowanie wielu związków. Metody te wykorzystują najnowsze techniki molekularne i mikroskopowe. Praca ta opiera się na wielu stosowanych już w zespole prof. Zakrzewskiej-Czerwińskiej metodach i stanowi dobre podsumowanie możliwości nowoczesnego warsztatu badawczego.

Wśród walorów rozprawy, podkreślić należy interesujący dobór modelu nie tylko z powodu potencjalnego znaczenia dla wyznaczenia celów terapii antyprątkowej, ale dla zrozumienia mechaniki replikacji chromosomu na modelu stosunkowo wolno dzielącej się bakterii, gdy dotychczasowe badania obejmowały głównie bakterie szybko rosnące.

Dodać można, iż rozprawa doktorska Pana Trojanowskiego stanowi świetny przykład nowoczesnego podejścia z szerokim zastosowaniem dostępnych możliwości i metod, także sposobów prezentacji wyników (np. filmy obrazujące dynamikę replikacji DNA i podziału komórek).

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład naukowy w wiedzę na temat mechaniki i biochemii replikacji chromosomu bakteryjnego, co wnosi dodatkowo informacje na temat możliwości zastosowania tej wiedzy w potencjalnej terapii zakażeń bakteryjnych. Rozprawa prezentuje oryginalne i cenne wiadomości, będące efektem dobrze przemyślanej, zaplanowanej i zrealizowanej pracy. Stwierdzam z pełnym przekonaniem, że rozprawa Pana mgr Damiana Trojanowskiego spełnia wszelkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim, stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Damiana Trojanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość naukową rozprawy wnoszę o nagrodzenie jej stosownym wyróżnieniem.

A. Szadevska-Peterson