

Dr hab. Aneta Agnieszka Bartosik
Pracownia Segregacji DNA i Cyklu Życiowego Proteobakterii
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
e-mail: anetab2@ibb.waw.pl
tel.: (+48 22) 592 1212

Warszawa 14.03.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Karoliny Płaskowskiej pt.
„Dynamika cyklu życiowego drapieżnej bakterii
***Bdellovibrio bacteriovorus* w komórkach różnych bakterii**
chorobotwórczych”

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Płaskowskiej stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Badania opisane w pracy zostały wykonane w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod opieką naukową promotora prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej oraz promotora pomocniczego dr Łukasza Makowskiego. Podjęta w pracy tematyka stanowi niezwykle ciekawy i prężnie rozwijający się nurt badań naukowych. Badania uzyskały finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 15 (2018/29/B/NZ6/00539). Doktorantka uczestniczyła w realizacji zadań badawczych projektu jako wykonawca, a prowadząc badania mogła korzystać z cennego doświadczenia, wiedzy i bogatego zaplecza badawczego stworzonego przez opiekunów pracy, współpracowników i uczelnię.

Mimo ogromnego postępu w nauce i medycynie, wciąż ważnym problemem pozostaje walka z infekcjami, które często nie mogą być opanowane ze względu na brak skutecznych leków. Przykładem mogą być infekcje wywoływane przez wielolekooporne bakterie chorobotwórcze. Rosnący stan wiedzy stwarza możliwości wykorzystania alternatywnych terapii przeciwdrobnoustrojowych np. z wykorzystaniem fagów lub bakterii drapieżnych. W recenzowanej dysertacji obiektem badań jest bakteria drapieżna *Bdellovibrio bacteriovorus*. Celem pracy były kompleksowe badania ważnych dla przeprowadzenia pełnego cyklu komórkowego procesów, takich jak replikacja, segregacja DNA i ich koordynacja z podziałem komórki w wybranych żywicielach będących bakteriami chorobotwórczymi.

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Płaskowskiej ma charakter hybrydowy i można w niej wyłonić dwie części. W pierwszej części zawarte są rozdziały charakterystyczne dla klasycznych rozpraw doktorskich jak: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wprowadzenie, Zakres oraz cel rozprawy doktorskiej, Wnioski, Podsumowanie, Bibliografia. Dwa osobne rozdziały w tej części poświęcono omówieniu opublikowanych prac zawartych w rozprawie doktorskiej, a także opisano dodatkowe eksperymenty wykonane przez Doktorantkę, których wyniki nie znalazły się w opublikowanych pracach. Natomiast część druga zawiera kopię dwóch publikacji naukowych oraz oświadczenia współautorów informujące o ich udziale w przygotowaniu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje dwa spójne tematycznie artykuły naukowe: artykuł oryginalny opublikowany w 2023 roku w międzynarodowym czasopiśmie *mBio* (ASM), którego współczynnik oddziaływania IF wynosi 6,4 (140 pkt MNiSW) oraz pracę przeglądową opublikowaną w 2023 roku w czasopiśmie *FEMS Microbiology Reviews*, którego współczynnik oddziaływania IF wynosi 11,3 (200 pkt MNiSW). Łączny współczynnik IF dla obu pozycji to 17,7 (340 pkt MNiSW).

Publikacja oryginalna stanowiąca podstawę dysertacji jest pracą wieloautorską. Doktorantka jest w niej pierwszym autorem, a udział w przygotowaniu manuskryptu i przeprowadzonych badaniach wynosi 75%. W dwuautorskiej pracy przeglądowej Pani mgr Karolina Płaskowska jest także pierwszym autorem z 70% udziałem w jej powstaniu. Potwierdzeniem tych faktów, są opisy wkładu współautorów prac, zamieszczone w dołączonych oświadczeniach współautorów, wskazujące na dominujący udział Pani mgr Karoliny Płaskowskiej w przygotowaniu i przeprowadzeniu kluczowych etapów części eksperymentalnej opisywanych badań, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Można tym samym bez wahania uznać, że Doktorantka była w obu pracach wiodącym autorem i badaczem i zgodnie ze stosowną Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym, spełnia wymagane kryteria, stawiane aktualnie przed autorami rozpraw doktorskich.

Tytuł rozprawy doktorskiej opisuje poruszaną tematykę i odzwierciedla cele i zakres badań. Praca jest napisana zwięźle, klarownie i stanowi bardzo ciekawą i wartościową lekturę.

Rozdział zatytułowany „Wprowadzenie” stanowi umiejętnie dobrany wstęp do tematyki podjętej w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej. Na 5 stronach, w syntetyczny sposób Doktorantka zaznajamia czytelnika z tematyką drapieźnictwa wśród bakterii, przytacza przykłady drapieźnych mikroorganizmów, by skupić się w dalszej części na bakteriach z grupy *Bdellovibrio*, a w szczególności na bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus* będącej obiektem badań w prezentowanej pracy. Doktorantka opisuje budowę oraz cykl życiowy *B. bacteriovorus*, zwracając uwagę na różne aspekty biologii tej bakterii, ważne dla interpretacji wyników prac eksperymentalnych przedstawionych w dysertacji. Wprowadzenie jest częściowo streszczeniem i uzupełnieniem wstępu publikacji oryginalnej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, a także pracy przeglądowej, która sama w sobie stanowi znakomity wstęp i podsumowanie podjętej tematyki badawczej.

Rozdział „Założenia oraz cel rozprawy doktorskiej”, zawiera właściwie sformułowane cele pracy, którymi była kompleksowa analiza kluczowych procesów komórkowych gwarantujących przeprowadzenie pełnego cyklu życiowego *B. bacteriovorus* w trakcie rozwoju w różnych Gram-ujemnych bakteriach będących patogenami. Zaplanowano analizy dynamiki replikacji oraz segregacji chromosomów oraz koordynacji tych procesów z podziałem komórki. W krótkim wstępie do rozdziału zamieszczono także informacje o istniejącym stanie wiedzy na temat *B. bacteriovorus*, zwracając uwagę na fakt, iż wiedza o cyklu życiowym tej bakterii pochodziła głównie z badań prowadzonych w komórkach *Escherichia coli* i nie było takich analiz wykonywanych w innych bakteriach, w tym chorobotwórczych.

W recenzowanej rozprawie nie ma osobnego rozdziału poświęconego opisowi materiałów i metod, natomiast wszystkie niezbędne informacje umożliwiające prześledzenie wykorzystywanych metod, materiałów Doktorantka zawarła w oryginalnej pracy wchodzącej w skład rozprawy, w tym w dołączonym do niej suplemencie. Wykorzystywane do realizacji zadań badawczych metody mikrobiologiczne, genetyczne, molekularne i bioinformatyczne zostały szczegółowo opisane, umożliwiając odtworzenie warunków eksperymentów. Warto podkreślić, że zastosowane metody badawcze zostały adekwatnie dobrane i świadczą o bardzo dobrym warsztacie metodycznym Pani mgr Karoliny Płaskowskiej. Na uwagę zasługuje zaprojektowanie aplikacji BdelloSim umożliwiającej obliczenie optymalnego stosunku komórek drapieżnika do komórki ofiary, np. w celu skuteczniejszej eliminacji bakterii patogennych.

W rozdziale „Omówienie prac zawartych w rozprawie doktorskiej” Doktorantka zawarła syntezę wiedzy przedstawionej w publikacjach. Przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy na temat cyklu życiowego drapieżnej bakterii *B. bacteriovorus* w komórce ofiary *E. coli*. W celu przeprowadzenia badań w innych komórkach gospodarzy, wybrano bakterie z opublikowanej w 2017 r. przez Światową Organizację Zdrowia listy patogenów stanowiących zagrożenie dla zdrowia człowieka - *Proteus mirabilis* (priorytet krytyczny), *Salmonella enterica* (priorytet wysoki) oraz *Shigella flexneri* (priorytet średni). Zwrócono uwagę by komórki gospodarzy różniły się wielkością. W celu śledzenia procesu replikacji i segregacji DNA w komórce *B. bacteriovorus* wykorzystano białka zaangażowane w te procesy DnaN oraz ParB w fuzji ze znacznikami fluorescencyjnymi mCherry lub mNeonGreen. Znakowane fluorescencyjnie białko septy FtsZ posłużyło do wizualizacji pierścienia podziałowego. W skonstruowanych szczepach *B. bacteriovorus* gen fuzyjny zastępował dziką kopię genu w natywnym locus chromosomu i był pod kontrolą natywnego promotora. Znakowane fluorescencyjnie białka obserwowano w trakcie trwania cyklu życiowego *B. bacteriovorus* w różnych gatunkach gospodarzy, z wykorzystaniem mikroprzepływowej mikroskopii fluorescencyjnej (*time lapse fluorescent microscopy*, TLFM) w czasie. Szczególną uwagę w pracy przykuwają zdjęcia oraz filmy umożliwiające śledzenie poszczególnych etapów cyklu życiowego *B. bacteriovorus* pozyskane dzięki zastosowaniu wspomnianej techniki.

Przeprowadzone przez Panią mgr Karolinę Płaskowską badania ujawniły, iż cykl życiowy *B. bacteriovorus* zależy od wielkości komórki ofiary, a nie od jej gatunku. Im większa była komórka żywiciela tym więcej komórek potomnych *B. bacteriovorus* mogło powstać w cyklu życiowym, dzięki podziałowi niebinarnemu i formowaniu wielogenomowego filamentu. Było to konsekwencją

możliwości reinicjacji procesu replikacji, asynchronicznego tworzenia pierścieni FtsZ w bdelloplacie. Czasoprzestrzenna koordynacja replikacji, segregacji DNA z tworzeniem pierścieni podziałowych umożliwiła zakończenie cyklu synchronicznymi podziałami prowadzącymi do powstania jednogenomowych komórek potomnych *B. bacteriovorus*. W mniejszych, krótszych komórkach żywiciela *B. bacteriovorus* dzieliła się w sposób binarny prowadząc do powstania dwóch komórek potomnych. Przeprowadzone badania pokazały po raz pierwszy, że bakteria w swoim cyklu rozwojowym może wykorzystywać podział binarny lub niebinarny w zależności od warunków, w tym przypadku zależny od wielkości komórki gospodarza. *B. bacteriovorus* może stanowić zatem organizm modelowy nad badaniami dwóch sposobów podziału komórki, a w szczególności mechanizmów kontrolujących te tryby w różnych gatunkach komórek gospodarzy.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę pokazały także, iż *B. bacteriovorus* inicjuje proces replikacji chromosomu na inwazyjnym biegunie komórki, a dalsze etapy namnażania DNA zależą od rodzaju podziału komórkowego – binarny lub niebinarny, czego konsekwencją jest powstanie dwóch lub większej liczby komórek potomnych. Wykazano także, że w niebinarnie dzielących się filamentach, ostatnia runda replikacji chromosomu inicjowana jest na biegunie nieinwazyjnym (wcześniejszym biegunie z rzęską), który po podziale staje się biegunem inwazyjnym. Choreografia procesu replikacji *B. bacteriovorus*, jak i cały cykl zależne są od wielkości komórki żywiciela. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w odniesieniu do najnowszych doniesień w poruszanej tematyce w rozdziale dyskusja prezentowanej pracy oryginalnej.

Praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, opublikowana w 2023 roku w renomowanym czasopiśmie *FEMS Microbiology Reviews* o dużym współczynniku oddziaływania, przedstawia podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat biologii bakterii *B. bacteriovorus*. Opisuje ona najważniejsze zagadnienia dotyczące rozwoju *B. bacteriovorus* w kontekście jej przeżycia i cyklu życiowego w różnych gospodarzach. Podsumowuje wiedzę dotyczącą organizacji i struktury chromosomu, jego dynamiki w trakcie replikacji, segregacji i koordynacji tych procesów z wykształceniem septy zależnie od przeprowadzanego podziału (binarny lub niebinarny). W pracy przedstawiono także zagadnienia opisujące mechanizmy kontroli procesu replikacji na etapie inicjacji replikacji. Zaznajomienie czytelnika z omawianą tematyką znacząco ułatwiają zawarte w pracy schematy, a porównania różnych aspektów biologii *B. bacteriovorus* z innymi bakteriami np. *E. coli*, *C. crescentus* czy *Streptomyces* sp. podkreślają znaczenie odkryć Doktorantki i wyjątkowość *B. bacteriovorus* ze względu na możliwość wykorzystania podziału binarnego lub niebinarnego zależnie od wielkości komórki ofiary. Praca wskazuje także kolejne kierunki badań, które powinny pomóc w odkryciu molekularnych mechanizmów zawiadujących cyklem życiowym charakteryzowanej bakterii drapieżnej. Praca przeglądowa odwołuje się do najnowszych doniesień literaturowych, a większość z nich powstała w przeciągu zaledwie kilku ostatnich lat.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera także rozdział zatytułowany „Dodatkowe eksperymenty” opisujący badania przeprowadzone przez Panią mgr Karolinę Płaskowską, których wyniki nie znalazły się w opublikowanej pracy oryginalnej. Doktorantka podjęła się próby identyfikacji regulatora inicjacji replikacji chromosomu *B. bacteriovorus* z wykorzystaniem

chromatografii powinowactwa i fragmentów DNA z regionu *oriC* chromosomu *B. bacteriovorus* znakowanych biotyną. Nie udało się jednak zidentyfikować białek zaangażowanych w kontrolę procesu replikacji *B. bacteriovorus*. Niepokojący jest fakt, iż nie udało się zidentyfikować białka DnaA w przeprowadzonych analizach, które mogłoby stanowić swoistą kontrolę pozytywną. Poproszę o komentarz w tej sprawie.

Pani mgr Karolina Płaskowska badała także czy komórki *B. bacteriovorus* mogą pasożytować jako epibionty na reprezentancie patogennych bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*. Przeprowadzono obserwacje mikroskopowe w czasie szczepu *B. bacteriovorus* mNeon-ParB/DnaN-mCherry inkubowanego z komórkami *S. aureus*. Wykazano, iż *B. bacteriovorus* jest w stanie przyłączyć się na krótko do komórek *S. aureus*, ale nie penetruje do ich wnętrza i nie może się namnażać będąc epibiontem.

Doktorantka podjęła także próbę otrzymania szczepu gospodarzo-niezależnego *B. bacteriovorus* i zbadania jego cyklu życiowego. Ze względu na trudności związane z prowadzeniem hodowli oraz dłuższych obserwacji komórek *B. bacteriovorus*, badania nie zakończyły się jednak powodzeniem i wymagają optymalizacji zastosowanych warunków.

Rozdział „Wnioski” i „Podsumowanie” zawierają syntezę oryginalnych wyników i osiągnięć przedstawionych w dysertacji w obrazowy sposób zaprezentowanych na Ryc. 6, umożliwiającej porównanie cyklu życiowego *B. bacteriovorus* z innymi reprezentatywnymi bakteriami modelowymi, jak *E. coli*, *C. crescentus* i *Streptomyces* sp.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych nielicznych nieścisłości, błędów:

- s. 9 - niepotrzebne wydaje się dodanie słowa „Wstęp” zaraz po tytule rozdziału „Wprowadzenie” – wystarczyłoby albo jedno, albo drugie;
- s. 17 – 3 akapit, powinno być „trwających w tym samym czasie” zamiast „trwających tym samym czasie”;
- s.19 - opis rysunku – powinno być „septacji filamentu” zamiast „septacji filament”;
- s. 22 - pierwszy akapit, powinno być „*Staphylococcus*” zamiast „*Staphyloccocus*”.

Należy jednak podkreślić, że wypunktowane nieliczne niedociągnięcia nie umniejszają bardzo wysokiej, pozytywnej ocenie rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników przez Panią mgr Karolinę Płaskowską.

Mam kilka pytań, kwestii, które nasunęły się po lekturze tej rozprawy, które zamieszczam poniżej, prosząc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony:

1. Czy próbowano skonstruować szczep *B. bacteriovorus* z wyznakowanymi trzema białkami DnaN, ParB, FtsZ w celu jednoczesnego śledzenia replikacji, segregacji oraz podziału komórki?
2. Jak komórki *B. bacteriovorus* chronione są przed degradacją własnych struktur w obrębie bdelloplasty?
3. Czy rozpoczęcie replikacji i/lub cyklu życiowego *B. bacteriovorus* w komórce gospodarza skorelowane jest np. z zanikiem błony wewnętrznej komórki żywiciela w bdelloplacie?

4. Czy można oszacować, a może prowadzono takie badania, czy w hodowlach szczepów żywicieli z *B. bacteriovorus* wszystkie komórki stają się ofiarami, czy część populacji potencjalnego gospodarza może przeżyć nabywając „odporność” na atak *B. bacteriovorus*?

5. Czy potencjalnie wszystkie bakterie Gram-ujemne mogą być gospodarzami *B. bacteriovorus* i czy znane są gatunki, których *B. bacteriovorus* nie atakuje?

Podsumowując, warto podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny pogłębiając wiedzę na temat biologii i cyklu życiowego drapieżnej bakterii *B. bacteriovorus*. Wysoko oceniam wartość merytoryczną oryginalnych wyników uzyskanych w pracy. Na uwagę zasługuje fakt ich opublikowania w renomowanym czasopiśmie *mBio*, a także ich przedstawienia i przedyskutowania w odniesieniu do najnowszych osiągnięć w postaci pracy przeglądowej, co umożliwi rozpropagowanie wyników i uzyskanej wiedzy wśród szerokiego grona odbiorców.

Do najważniejszych wyników prezentowanych w rozprawie należy wykazanie zależności przebiegu cyklu życiowego bakterii drapieżnej *B. bacteriovorus* od wielkości komórki ofiary należącej do bakterii Gram-ujemnych. Po raz pierwszy pokazano, iż bakteria może przeprowadzać podział binarny lub niebinarny w zależności od warunków wzrostu, odpowiednio koordynując procesy replikacji, segregacji oraz podziału komórki. Pokazano także, iż *B. bacteriovorus* nie może wykorzystywać bakterii Gram-dodatnich w celu namnażania. Uzyskane przez Panią mgr Karolinę Płaskowską wyniki, są szczególnie cenne w kontekście poznania mechanizmów umożliwiających żerowanie *B. bacteriovorus* na bakteriach chorobotwórczych i wykorzystania tej wiedzy do leczenia infekcji wywołanych przez bakterie wielolekooporne.

Recenzowana praca i uzyskane wyniki ujawniają samodzielność, zaangażowanie i dużą wiedzę Doktorantki, tak w zakresie poruszanych zagadnień naukowych, jak i stosowanych metod, co potwierdza umiejętność Pani mgr Karoliny Płaskowskiej do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienie badawcze i uzyskane oryginalne wyniki charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi, o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym i terapeutycznym.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej ustawie (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Z pełnym przekonaniem i poparciem zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Płaskowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy, merytoryczny prezentowanej rozprawy i przeprowadzonych badań, umożliwiających powstanie dwóch niezależnych artykułów naukowych, a także ze względu na poznawcze i praktyczne znaczenie uzyskanych wyników wnioskuję o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.

Dr hab. Aneta Bartosik