



prof. dr hab. Grażyna Jagura-Burdzy
Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa
ul. Pawińskiego 5A

Warszawa 20.01.2018

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Olesi Werbowy pt. "Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za stabilne dziedziczenie oraz rozprzestrzenianie plazmidów niosących systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II" wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Tadeusza Kaczorowskiego.

Zagadnienie stabilnego dziedziczenia plazmidów jest bardzo istotne nie tylko ze względów czysto poznawczych ale i aplikacyjnych. Zrozumienie mechanizmów stabilizujących plazmidy w populacji może pozwolić dowolnie modyfikować stabilność wektorów dla potrzeb biotechnologicznych czy ułatwić eliminację plazmidów np. odpowiedzialnych za szerzenie się antybiotykooporności wśród szczepów klinicznych. Odkrycie w końcu lat 90-tych przez Kobayashi i wsp. udziału kodowanych plazmidowo systemów restrykcja-modyfikacja w stabilizacji plazmidów zaliczyło je do mechanizmów stabilizacyjnych podobnych do toksyna-antytoksyna i określanych jako addukcyjne. Utrata przez dzielącą się komórkę plazmidu z systemem RM sprawia, że ilość pozostałej w cytoplazmie metylazy nie zabezpiecza nowo replikowanego DNA przed restryktazą co prowadzi do degradacji genomu i śmierci komórki, w populacji pozostają więc komórki z plazmidem przenoszącym RM.

1. Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje trzy spójne tematycznie prace oryginalne, z których dwie opublikowane zostały w PloS One a jedna w Plasmid w latach 2015-2017. W pracach tych o łącznym współczynniku istotności IF 7,55 mgr Olesia Werbowy jest pierwszą autorką a z oświadczeń współautorów dołączonych do rozprawy wynika, że pełniła ona wiodącą rolę w planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu wyników a także współuczestniczyła w pisaniu manuskryptów. Załączone publikacje poprzedzone są w rozprawie krótkim 5- stronicowym streszczeniem wyników i konkluzji prac. Podana jest również informacja o źródłach finansowania: grantie NCN, w którym autorka pełniła funkcję wykonawcy i grantie Młodego Badacza, w którym była kierownikiem i wykonawcą. Podsumowując ocenę formalną stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia podstawowe kryteria przyjęte dla tego typu opracowań.

2. Ocena merytoryczna

Taki charakter rozprawy doktorskiej właściwie zwalnia recenzenta z jego obowiązków oceny merytorycznej rozprawy, z wyjątkiem oceny formalnej załączonych dokumentów (jak wyżej). Oceny merytorycznej dokonali już recenzenci czasopism, w których opublikowano te artykuły.

Rozprawa doktorska zawiera 5-stronicowe streszczenie załączonych trzech prac. Z punktu widzenia recenzenta uważam, że wprowadzenie do zagadnienia stabilności plazmidów powinno być potraktowane znacznie szerzej a znaczenie uzyskanych wyników skomentowane na tle danych literaturowych. Na podstawie kilku stron streszczenia trudno mi ocenić wiedzę autorki czy umiejętność poruszania się w literaturze na poparcie swoich tez. Dodatkowo, tytuł „Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za stabilne dziedziczenie oraz rozprzestrzenianie plazmidów niosących systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II” sugeruje analizę więcej niż jednego plazmidu z określonym systemem RM a rozprawa dotyczy jednego modelu plazmidowego. Do tego autorka powinna odnieść się we wstępie.

W czasie czytania tych trzech prac nasunęły mi się pewne uwagi i pytania, które przedstawiam poniżej i proszę o komentarz.

Celem pracy doktorskiej była analiza mechanizmów odpowiadających za stabilne utrzymywanie się i rozprzestrzenianie się plazmidu pEC156. Plazmid ten wyizolowano ze szczepu *Escherichia coli* E1585-68 o serotypie O156 i należy on do wysokokopijnych plazmidów typu ColE1. Jak inne plazmidy wysokokopijne i ten plazmid segreguje losowo a odpowiednio wysoka liczba jego kopii w komórce jest zabezpieczana przez system miejscowo specyficznej- rekombinacji *Xer/cer*, od którego zależy monomeryzacja dimerów/multimerów tworzących się w czasie replikacji czy w wyniku rekombinacji homologicznej między identycznymi kopiami. Interesującym aspektem tego plazmidu jest przenoszenie systemu restrykcji-modyfikacji EcoVIII (typu II) i rola tego systemu w stabilnym utrzymywaniu się plazmidu poprzez sugerowane post-segregacyjne zabijanie komórek, które utraciły plazmid. W pierwszej z prac w *Plasmid* (2015) potwierdzono bardzo istotną rolę systemu *Xer/cer* i mniej istotną stabilizacyjną rolę systemu RM.

W kolejnej pracy zaproponowano model teoretyczny, który miał pomagać w analizie stabilności plazmidów w populacjach bakterii. Plazmidem modelowym był pEC156 i jego warianty pozbawione *locus cer* lub/i systemu RM. Do badań włączono szczep *E. coli* typu dzikiego, mutantu *pcnB*, w którym plazmidy ColE1 mają niską liczbę kopii (1-2 na chromosom) i szczep *sbcA* o podwyższonej zdolności do rekombinacji homologicznej. Uzyskane dane doświadczalne stały się podstawą modelu matematycznego opracowanego przez współautora pracy. W założeniu modelu przyjęto różne uproszczenia np., że każda cząsteczka plazmidu replikuje się raz w czasie cyklu komórkowego. Czy doktorantka może ustosunkować się do danych literaturowych na ten temat? Co wiadomo o mechanizmach regulacji liczby kopii każdego plazmidu w komórce? Czym uwarunkowane było ich pominięcie w tym modelu?

W trzeciej pracy wykazano, że plazmid pEC156 jest plazmidem mobilizowalnym przez dwa plazmidy koniugacyjne F (IncF1) i R64 (Inc11) o wąskim spektrum gospodarzy (*Enterobacteriaceae*).

Wykazano negatywny wpływ obecności systemu RM na plazmidzie pEC156 w biorcy na częstość powstawania transkoniugantów z plazmidem F co wynikało prawdopodobnie z obecności w plazmidzie F miejsc rozpoznawanych przez restryktazę EcoVIII. Aktywny system RM w dawcy (na pEC156) obniżał zdolności koniugacyjne F i mobilizacyjne plazmidu F (w stosunku do pEC156) między różnymi gatunkami *Enterobacteriaceae* ale nie pomiędzy szczepami *E. coli*. Jak to można interpretować?

Bardzo interesujące były wyniki dotyczące wpływu obecności systemu RM na uwalnianie DNA plazmidowego do podłoża. Czy wykazano licę komórek a jeśli tak to jak wydajny jest to proces?

Chciałabym dodatkowo prosić doktorantkę

-o krótkie podsumowanie postulowanych funkcji systemów restrykcji-modyfikacji w bakteriach, ze szczególnym uwzględnieniem systemów RM kodowanych plazmidowo;

- oraz o porównanie „obronnych” właściwości systemów RM i CRISPR-cas.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Olesi Werbowy spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Olesi Werbowy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

G. Jopina-Bud