



SPOŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Łódź, 08. 11. 2016

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie

Prof. zw. Społecznej Akademii Nauk w Łodzi

Dyrektor Instytutu Nauk o Zdrowiu

Łódź, ul. Gdańska 121

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Grzegorza Marka Cecha
pt. „Wpływ delekcji genu *hfq* bakterii *Escherichia coli* na regulację replikacji DNA
oraz na rozwój bakteriofaga P1vir”**

Praca doktorska mgr Grzegorza Marka Cecha została zrealizowana w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej - Pałasz. Praca ma postać obszernej (170 stron), bardzo starannie przygotowanej monografii, opracowanej w sposób typowy dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. W jednostronicowym *Streszczeniu* pracy, napisanym w języku polskim i angielskim, Doktorat bardzo dobrze uzasadnił wybór tematu i obiektu badań oraz sformułowane cele poznawcze, następnie wskazał nowoczesne techniki i metody badawcze, które zastosował dla realizacji nakreślonych celów badawczych, a w ostatnim, dwuzdaniowym akapicie bardzo umiejętnie podsumował wszystkie uzyskane wyniki stwierdzając, cyt. „*Otrzymane wyniki wskazują, iż białko Hfq może brać udział w regulacji procesu replikacji DNA wielu replikonów, choć pełny, złożony mechanizm jego działania pozostaje nie do końca poznany. Dodatkowo stwierdzono, iż białko Hfg pełni istotną, globalną rolę w prawidłowym rozwoju bakteriofaga P1vir, poprzez modulację wielu procesów w komórce gospodarza, jak i mechanizmów regulujących rozwój bakteriofaga*”.

Recenzent po przeczytaniu Streszczenia miał ułatwione zadanie, bowiem szczegółowe wyniki, uzyskane na kolejnych etapach pracy doktorskiej, oceniał w świetle wyżej cytowanego, autorskiego podsumowania.

Treści części teoretycznej pracy (Wstępu) zostały ściśle podporządkowane tematowi i celom pracy. W pierwszym z trzech podrozdziałów, mgr Grzegorz Marek Cech bardzo dogłębnie omawia budowę, strukturę oraz znane i nowo odkrywane funkcje biologiczne białka Hfq oraz innych białek bakteryjnej chromatyny, w drugim podrozdziale przedstawia bardzo złożone mechanizmy regulacji replikacji DNA chromosomu *E. coli* oraz różnych plazmidów bakterii, wraz z zaangażowaniem w te procesy kluczowych białek, w trzecim zaś podrozdziale charakteryzuje właściwości biologiczne oraz strategie rozwojowe i ewolucyjne modelowego bakteriofaga P1vir.

Wyrażam w tym miejscu uznanie dla wiedzy mgr Grzegorza Marka Cecha w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej bakterii, plazmidów i bakteriofagów. Część teoretyczna pracy

została opracowana z dużym znanstwem, w oparciu o bardzo obficie cytowane prace oraz monografie literatury światowej, w tym w bardzo dużej części o prace opublikowane w ostatnich 5-10 latach. Myślę, że warto byłoby rozważyć opublikowanie np. w *Postęпах Mikrobiologii* treści chociażby pierwszego podrozdziału, w którym opisano wiele nowych danych i informacji o budowie i funkcjach biologicznych białek wiążących się z DNA i RNA, ich zaangażowania w regulację procesów komórkowych na poziomie DNA i RNA, jak też na poziomie globalnej organizacji i regulacji aktywności bakteryjnej chromatyny i nukleoidu.

Jako redaktor naczelny nowego czasopisma *Journal of Health Study and Medicine*, wydawanego przez Instytut Nauk o Zdrowiu, Społecznej Akademii Nauk w Łodzi, a także popularyzator osiągnięć nauk biologicznych i medycznych - chciałbym bardzo pięknie poprosić Pana mgr Grzegorza Marka Cecha i Panią Promotor, prof. dr hab. Agnieszkę Szalewską Pałasz, o napisanie dla studentów różnych kierunków biologii i zdrowia publicznego artykułu popularno - naukowego pt. „Modelowy bakteriofag P1”. Podobałoby mi się przesłanie takiego artykułu, które odnalazłem na 50 stronie ocenianej pracy doktorskiej, cyt. „Bardzo wiele zagadnień biologii i genetyki bakteriofaga P1 zostało opisanych w czasie ponad pół wieku badań, łącznie z opublikowanym w 2004 roku genomem tego faga (Łobočka i wsp., 2004). Mimo to, bakteriofag P1 jest ciągle interesującym obiektem badawczym oraz modelem wielu procesów, w tym replikacji DNA”.

Jestem pod dużym wrażeniem możliwości warsztatowych, jakie są dostępne obecnie dla Studentów i Doktorantów, realizujących cele prac magisterskich i doktorskich w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Zastosowane w ocenianej pracy doktorskiej analizy fenomiczne, z wykorzystaniem mikromacierzy fenotypowych, obejmujące 10 płytek metabolicznych i 10 płytek wrażliwości na różne substancje, zostały, co prawda, wykonane przez firmę Biolog. Inc. Hayward, USA, ale wizualizacja ogromnej liczby danych oraz interpretacja biologiczna uzyskanych profili fenotypowych została wykonana przez Doktoranta. Analiza transkryptomyczna, na etapie izolacji RNA, jego oczyszczenia, jakościowej i ilościowej oceny otrzymanych preparatów, zostały przeprowadzone samodzielnie przez Doktoranta, ale konstrukcja bibliotek do sekwencjonowania RNA, a także sekwencjonowanie nowej generacji na platformie Illumina (typu *Paired-End*) zostało przeprowadzone w *University of Alabama et Birmingham*, USA, a wstępna analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania została wykonana przez firmę Ideas4 Biology Sp. z o. o (Polska). Podkreślić jednak należy, że analiza bioinformatyczna, obejmująca interpretację biologiczną zbiorów genów, za pomocą adnotacji funkcjonalnych, w tym analiza terminów ontologii genowych, została wykonana samodzielnie przez Doktoranta. Badania wpływu delekcji genu *hfg* na kinetykę replikacji chromosomu bakterii oraz plazmidów z *oriC*, *origin* pMB1, *origin* p15A, przeprowadzono, odpowiednio, poprzez pomiar wcielania do DNA radioaktywnego prekursora oraz fluorymetryczny pomiar ilości syntetyzowanego plazmidowego DNA. Dodać należy w tym miejscu, że Doktorant biegle opanował specjalistyczne, metody i techniki mikrobiologiczne, molekularne i genetyczne, stosowane w analizie cyklów rozwojowych bakteriofagów, w molekularnych badaniach plazmidów bakterii oraz w mikroskopowej analizie morfologii wirionów.

Komentowany wyżej bardzo nowoczesny warsztat badawczy, wdrożony z dużym powodzeniem przez mgr Grzegorza Marka Cecha do realizacji postawionych celów Jego pracy doktorskiej, utwierdza mnie w przekonaniu, że udokumentowane i opisane w monografii wyniki są w pełni wiarygodne.

Przystępując do oceny uzyskanych rezultatów, opisanych w monografii doktorskiej mgr Grzegorza Marka Cecha, muszę przyznać, że nie jestem w stanie ocenić wszystkich rezultatów pracy, ładnie udokumentowanych i krok po kroku opisanych w rozdziale *Wyniki*, a następnie z dużym znanstwem, niekiedy nawet zbyt drobiazgowo dyskutowanych na tle danych literatury światowej.

Sposób opracowania rozdziału Wyniki i styl napisanego rozdziału Dyskusja dowodzą, po pierwsze, że mgr Grzegorz Marek Cech posiada ugruntowaną wiedzę na temat bardzo złożonych mechanizmów i procesów biologii molekularnej i genetyki bakterii, a także na temat plazmidów bakteryjnych oraz bakteriofagów. Po drugie, wskazują, że potrafi nie tylko umiejętnie, logicznie interpretować własne wyniki, ale także formułować uprawnione hipotezy badawcze.

Za ważne rezultaty, opisane w podrozdziale 4.1, uznaję wyniki analizy fenomicznej mutantu Δhfq i szczepu dzikiego z użyciem mikromacierzy fenotypowych w postaci 1920 indywidualnych testów fenotypowych odpowiedzi metabolicznej, to jest wykorzystania różnych źródeł węgla, fosforu i siarki oraz wrażliwości na różne związki chemiczne. Myślę, że najważniejsze wyniki z tej analizy są zaprezentowane na rys. 15 (str. 74). Okazało się bowiem, że utrata zdolności syntezy białka Hfq czyni komórki mutantu bardzo wrażliwymi na związki chemiczne interferujące z DNA, w tym związki uszkadzające DNA oraz interkalujące z DNA, a także na analogii kwasów nukleinowych i inhibitory syntezy DNA. Postawiono więc uzasadnione pytanie, czy większa wrażliwość mutantu na wyżej wymienione substancje jest skorelowana z ekspresją genów związanych z metabolizmem DNA. Wyniki analizy transkryptomów mutantu Δhfq wobec szczepu dzikiego, przedstawione na rys.: 16 A i B, 17 i 18. dowodzą, że udało się zidentyfikować ponad 50 genów o zmienionej ekspresji, związanych z szeroko pojętym metabolizmem DNA. Co prawda, dla większości zidentyfikowanych genów zmiany przyjmują niskie wartości (z przedziału 1,1 do 2,0, czyli 110 -200%), ale w przypadku kilku genów zaobserwowano zmianę ekspresji nawet wyższą niż dwukrotna. Dalsza bioinformatyczna analiza wzbogacenia terminów ontologii genowych (ang. *enrichment analysis*) pozwoliła na adnotację funkcjonalną 15 genów o zmienionej ekspresji (tabela 4). Geny te zaangażowane są w procesy związane z replikacją, rekombinacją oraz naprawą błędów i uszkodzeń DNA.

Myślę, że wskazanie, iż białko Hfq kontroluje w sposób bezpośredni lub pośredni tak wiele i tak ważnych genów dla życia i rozwoju komórki bakteryjnej - jest znacznym osiągnięciem naukowym, otwierającym drogę do poznania molekularnego mechanizmu tej regulacji.

Wyniki drugiego podrozdziału (4.2) dotyczą wpływu delecji genu *hfq* na proces replikacji DNA chromosomu i plazmidów noszących różne *ori*, na wydajność transformacji oraz na wydajność syntezy DNA. Jest to z jednej strony kontynuacja, z drugiej zaś rozszerzenie badań, dotyczących wpływu deficytu białka Hfq na kinetykę replikacji plazmidów, których wyniki Doktorant opisał w pracy opublikowanej w 2014 roku w czasopiśmie *Plasmid*. Przyznam, że po uważnej analizie wszystkich wyników i przestudiowaniu ich interpretacji, dokonanej przez Doktoranta - trudno mi jest ocenić jednoznacznie ich wartość naukowo-poznawczą, aczkolwiek doceniam wkład pracy włożony w te badania. Ten wpływ jest bardziej lub mniej wyraźny, w zależności od modelu badań (rodzaju *ori*), warunków hodowli i fazy wzrostu. Wyniki wydajności/kinetyki syntezy DNA dla badanych plazmidów, przedstawione na rys. 21-26, obrazują jednak pewną generalną tendencję. Stąd, uważam, że wniosek końcowy sformułowany na stronie 129 monografii, jako podsumowanie wszystkich wyników opisanych w rozdziale 4.2, znajduje w świetle tych wyników generalne uzasadnienie w sformułowaniu Doktoranta, cyt. „Synteza

chromosomalnego DNA, jak również DNA wielu plazmidów (w tym tych zawierających origin: *oriC*, *ColE1*-podobnych, *pSC101*, *P1*) jest efektywniejsza w komórkach mutantu Δhfq w porównaniu do szczepu typu dzikiego).

Zgadzam się z Doktorantem, że ważnym elementem możliwego mechanizmu zaangażowania białka *Hfq* w proces replikacji może być jego funkcja jako regulatora kondensacji chromatyny bakteryjnej. Można zatem domniemywać, że brak lub deficyt w komórce tego białka rozluźnia chromatynę, a stąd nici DNA stają się bardziej dostępne dla kompleksu replikacyjnego. Sądzę, że obecnie tą interesującą hipotezę byłoby chyba dość łatwo zweryfikować poprzez wykorzystanie techniki mikroskopii elektronowej oraz fluorescencyjnej mikroskopii przepływowej w czasie rzeczywistym.

Z dużym zainteresowaniem przestudiowałem rezultaty przedstawione w rozdziale 4.3 monografii doktorskiej mgr Grzegorza Marka Cecha, w szczególności zaś dotyczące analizy zmian w obrębie transkryptomów w dynamicznym układzie gospodarz - wirus. Bardzo dobrze zaplanowane doświadczenia, przeprowadzone w czasie infekcji, odpowiednio, mutantu Δhfq oraz szczepu typu dzikiego *E. coli*, zainfekowanego bakteriofagiem P1vir. Stwierdzam, że sformułowane przez Doktoranta wnioski końcowe na 130 monografii, jako autorskie podsumowanie wszystkich wyników opisanych w tym rozdziale, mają w moim przekonaniu pełne uzasadnienie, w świetle szczegółowych wyników, graficznie przedstawionych na rysunkach od 28 do 31 oraz w tabeli 5.

Po uważnym przestudiowaniu tej części pracy doktorskiej mgr Grzegorza Marka Cecha nie mam wątpliwości, iż brak w komórce bakterii funkcjonalnego białka *Hfq*, w sposób istotny zmienia dynamikę układu wirus-gospodarz. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że bakteriofag P1vir w komórkach mutantu Δhfq namnaża się mniej wydajnie w komórkach szczepu dzikiego niż w szczepie wyjściowym, ale co bardzo ciekawe, w komórkach typu dzikiego, w przeciwieństwie do mutantu Δhfq , w czasie przebiegu cyklu litycznego, prowadzi sukcesywnie do wyłączenia coraz większej liczby genów, odpowiedzialnych za ważne procesy komórkowe i molekularne. Ważne, nowe spostrzeżenia dotyczą także mian w poziomie ekspresji genów fagowych. Zdecydowana większość genów fagowych, w czasie przebiegu infekcji w mutancie Δhfq , charakteryzowała się obniżoną wartością ekspresji, w porównaniu do szczepu dzikiego. Zaledwie kilka z genów fagowych ujawniło nieznacznie podwyższoną ekspresję (o 10-20%) w analizowanym okresie czasu cyklu litycznego. Zaobserwowane zmiany w ekspresji niektórych genów, potencjalnie związanych z morfogenezą wirionów, nie znalazły odzwierciedlenia w postaci istotnych różnic morfologicznych analizowanych wirionów, tworzonych w czasie rozwoju bakteriofaga P1vir w komórkach mutantu Δhfq oraz w szczepie typu dzikiego.

Zgadzam się więc z końcowym, bardzo generalnym wnioskiem, sformułowanym przez mgr Grzegorza Marka Cecha na stronie 130 monografii cyt:

„Białko *Hfq* pełni istotną rolę w prawidłowym rozwoju bakteriofaga P1vir”.

Doktorant przyznaje jednak skromnie, że diskutowany „mechanizm działania pozostaje nadal nieznan”. Stawia też uprawnioną, popartą w znacznej mierze własnymi doświadczeniami i wynikami hipotezę, że „mechanizm ten ma charakter regulacji globalnej”, a następnie logicznie uzasadnia to stwierdzenie - „ponieważ białko *Hfq* moduluje wiele procesów zarówno w komórce gospodarza, jak też wpływa na rozwój infekującego ją bakteriofaga”.

W zakończeniu mojej oceny całej pracy doktorskiej pragnę wyróżnić skonstruowany przez Doktoranta schemat działania białka Hfq w procesie regulacji replikacji DNA (rys.33) obejmujący: oddziaływania pośrednie związane z ryboregulacją oraz procesy związane z DNA, to jest organizacją nukleoidu oraz regulacją replikacji DNA. Schemat ten, bardzo zwięźle uzupełniony schematem wiązania się białka z DNA i zdjęciami autorstwa dr Christopha Lavella, dobrze ilustruje ogromną złożoność tych interakcji, zachodzących na bardzo wielu poziomach procesów molekularnych i komórkowych bakterii.

Wnioski końcowe

W oparciu o dokonaną analizę poznawczych treści naukowych pracy doktorskiej mgr Grzegorza Marka Cecha, opracowanej w postaci autorskiej monografii, a także na podstawie własnej wiedzy na temat kierunków poszukiwań naukowych w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki bakterii, realizowanych konsekwentnie od lat, z bardzo dużym powodzeniem w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego stwierdzam, że oceniana praca doktorska mgr Grzegorza Marka Cecha spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Marka Cecha do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

W moim osobistym, subiektywnym uznaniu, dla wartości poznawczej wyników opisanych w ocenianej pracy doktorskiej, a w tym wyników już opublikowanych w 2014 roku w postaci pracy doświadczalnej w czasopiśmie Plasmids, w której mgr Grzegorz Marek Cech jest pierwszym autorem, a także w oparciu o informację uzyskaną od Pani Promotor, prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej, że ważne, w znacznej części nowe, oryginalne wyniki, dyskutowane przez recenzenta w ocenianej pracy doktorskiej, są na końcowym etapie przygotowania kolejnej pracy do druku - wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o stosowne wyróżnienie tej bardzo dobrej pracy doktorskiej, zrealizowanej z wykorzystaniem bardzo nowoczesnych „narzędzi badawczych”.