

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

Gdańsk, 11.12.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Piotra Kopera
„Charakterystyka białek RepB i ich udział w aktywnej segregacji plazmidów
***Rhizobium leguminosarum*”**

Bakterie stanowią różnorodną i jedną z najliczniejszych grup organizmów. Zajmują one bardzo zróżnicowane ekosystemy, pełniąc wiele funkcji, zależnie od ich sposobu życia i odżywiania. Dla przykładu, są bardzo istotnymi producentami biomasy w środowiskach morskich, odgrywają ważną rolę w obiegu materii i w cyklach biogeochemicznych. Poza dobrze poznanymi z oczywistych względów bakteriami chorobotwórczymi, zainteresowanie naukowców wzbudzają bakterie niepatogenne, których obecność i działania przynoszą korzyści innym organizmom danego ekosystemu. Do takich mikroorganizmów należą bakterie glebowe, zdolne do wchodzenia w stan symbiozy z roślinami, a w szczególności bakterie z rodzajów *Rhizobium* i innych alfa- i beta-proteobakterii, zwanych łącznie rizobiami, tworzących interakcje symbiotyczne z roślinami bobowatymi. Bakterie te ułatwiają roślinie dostęp do azotu, przyspieszając jej wzrost, korzystając jednocześnie z dostarczanych przez roślinę węglowodanów. Symbioza ta jest możliwa dzięki specyficznym interakcjom między rośliną a bakterią, prowadzących do utworzenia brodawek, w których bakteria może bytować i gdzie dokonuje się wymiana korzyści między obydwoma stronami układu symbiotycznego. Tak

złożone interakcje z rośliną wymagają skomplikowanych mechanizmów molekularnych i sygnałowych, umożliwiających zawiązanie i utrzymanie symbiozy. Z uwagi na ważną rolę pełnioną przez rizobia w obiegu azotu oraz w rolnictwie, przyczyniając się do zwiększania produktywności roślin, dokładne poznanie biologii tych bakterii, wraz z budową ich genomu, jest bardzo istotne i stanowi przedmiot badań wielu ośrodków naukowych na świecie. W ten nurt badawczy bardzo dobrze wpisuje się rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Kopera. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Mazura. W Zakładzie tym od wielu lat prowadzone są szeroko zakrojone badania nad rizobiami, ich biochemią, genetyką i mechanizmami symbiozy z organizmami roślinnymi. Dzięki temu Pan mgr Koper podczas realizacji swojej pracy doktorskiej mógł i z powodzeniem skorzystał z wielkiego doświadczenia i warsztatu badawczego zespołu, co przyniosło w rezultacie rozprawę doktorską utrzymaną na wysokim poziomie i o dużych walorach poznawczych.

Poznanie podstaw genetycznych procesów zachodzących w mikroorganizmach i prowadzących do złożonych interakcji z organizmem gospodarza jest bardzo ważnym aspektem badawczym, przynoszącym poza dostarczeniem informacji z dziedziny badań podstawowych, także wiedzę mogącą znaleźć zastosowanie w gospodarce i biotechnologii. Rizobia, do których należy modelowy gatunek *Rhizobium leguminosarum*, charakteryzują się częstym występowaniem plazmidów, niosących m.in. geny związane z symbiozą i adaptacją do środowiska. Plazmidy te typowo mają stosunkowo duże rozmiary, występują w niskiej liczbie kopii i są utrzymywane stabilnie w komórkach bakterii. Ponadto, często współwystępuje kilka niezależnych plazmidów w jednej komórce bakteryjnej, co więcej, plazmidy te mogą należeć do jednego typu replikonów, rodziny repABC, charakteryzując się podobną budową elementów plazmidu odpowiedzialnych za jego replikację i rozdzielenie do komórek potomnych po podziale (*R. leguminosarum* posiada cztery takie plazmidy). Podobieństwa w sposobie powielania i partycji plazmidu, jak i istotna dla komórki rola genów przenoszonych na tych plazmidach wskazuje, iż konieczne są precyzyjne mechanizmy pozwalające na niezależną replikację i segregację kilku replikonów w komórce. Celem pracy doktorskiej Pana Piotra Kopera było zbadanie mechanizmów segregacji plazmidów tej bakterii, a w szczególności poznanie roli białek typu RepB, uczestniczących w procesie partycji. Białka RepB jest jednym z trzech białek

kodowanych przez operon *repABC* charakterystyczny dla plazmidów tego typu, i pełni zazwyczaj funkcję wiązania z sekwencją centromerową chromosomu bakteryjnego, tworząc razem z białkiem RepA moduł partycyjny, gdy zaś białko kodowane przez położony w tym samym operonie gen *repC* stanowi element niezbędny dla replikacji. W niniejszej rozprawie Doktorant w szeregu dobrze zaplanowanych i opisanych etapów pracy zbadał funkcjonalność modułów kasety *repABC* plazmidów *R. leguminosarum* *in vivo*, oraz scharakteryzował właściwości białek RepB tych plazmidów metodami *in vitro*.

Jako główne osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pana mgr Piotra Kopera można wymienić:

- identyfikacja i opisanie modułowej struktury kaset replikacyjnych *repABC* plazmidów *R. leguminosarum*,
- określenie minimalnego replikonu tych plazmidów obejmującego gen *repC* zawierający origin replikacji oraz jednocześnie wykazanie niestabilności segregacyjnej takich plazmidów, przy zastosowaniu konstruktów zawierających specyficzne elementy kaset *repABC* i bezplazmidowego szczepu *Agrobacterium tumefaciens*,
- określenie mechanizmów utrzymywania w komórce czterech plazmidów posiadających podobne systemy replikacji i segregacji, których podstawą jest wysoka specyficzność oddziaływania między sekwencjami centromerowymi a białkami RepB,
- odkrycie zdolności białek RepB do oligomeryzacji oraz znaczenia tego procesu,
- analiza funkcji poszczególnych domen białek RepB - N-końcowej, odpowiedzialnej za interakcję z białkiem partycyjnym RepA, C-końcowej, umożliwiającej oligomeryzację oraz motywu helisa-skręt-helisa w części centralnej, odpowiedzialnej za wiązanie z sekwencją centromeropodobną.

Cele postawione w pracy zostały zrealizowane przy pomocy właściwie dobranych eksperymentów, których wyniki są dobrze udokumentowane i zinterpretowane. Metodyka stosowana w pracy obejmuje techniki mikrobiologiczne, konstrukcję plazmidów, optymalizację nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanych białek, badania *in vitro*: wiązania białek do DNA (metoda EMSA) i sieciowania molekularnego. Należy szczególnie podkreślić nakład pracy i

systematyczność w analizie mechanizmów powielania i segregacji czterech niezależnych replikonów w skomplikowanym układzie eksperymentalnym.

Poniżej przedstawiam kilka uwag i pytań odnoszących się do części eksperymentalnej pracy:

1. Jaki jest zakres specyficzności gospodarza plazmidów zidentyfikowanych u *R. leguminosarum*?
2. Czy częste wśród rizobiów jest występowanie szczepów nie zawierających pozachromosomalnych elementów genetycznych, tak jak zastosowany w pracy *Agrobacterium tumefaciens*? Czy szczepy takie mają niższą zdolność adaptacyjną do środowiska?
3. Jaki może być powód niskiej, zaledwie 40%, liczby bakterii zawierających plazmid (pDbC i pDcC) podczas rozpoczęcia eksperymentu analizy stabilności plazmidów (Ryc.11)?
4. Jak można zweryfikować obecność hipotetycznych kointegratów plazmidu z chromosomem lub z innym plazmidem (str. 84), co zostało podane jako wyjaśnienie zmian w profilu plazmidowego po wprowadzeniu do komórki sekwencji centromeropodobnych?
5. W doświadczeniach badania wiązania białek RepB do DNA (EMSA) przydatne byłoby ilościowe oznaczenie (metodą densytometrii) poziomu związanego i wolnego DNA.
6. Czy znane jest komórkowe stężenie białka RepB?
7. Czy oczyszczone rekombinowane białka RepB zawierające znacznik histydynowy charakteryzują się takimi samymi właściwościami jak białka natywne? Czy nie byłoby celowe zastosowanie wektorów umożliwiających enzymatyczne usunięcie znacznika His po oczyszczeniu białka?
8. Jaka jest korzyść ewolucyjna dla komórki *Rhizobium* w posiadaniu czterech niezależnych replikonów plazmidowych (zamiast jednego lub dwóch niosących te same geny nadające bakteriom przewagę selekcyjną), tym bardziej iż ich system replikacji i partycji musi być bardzo precyzyjny i wydajny?

Rozprawa doktorska Pana Piotra Kopera ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Wstęp podaje jasno i wyczerpująco informacje niezbędne dla zrozumienia i docenienia wyników prezentowanych w pracy, dzieli się on na dwie główne części - opis różnych mechanizmów replikacji i segregacji pozachromosomalnych elementów genetycznych oraz szczegółową

charakterystykę plazmidów z grupy repABC. W zakończeniu tego rozdziału podany jest obecny zakres wiedzy o przedmiocie pracy, a więc plazmidach *R. leguminosarum*. Rozdział Materiały i metody obejmuje opis stosowanych pracy gatunków i szczepów bakterii, wektorów i plazmidów skonstruowanych w ramach pracy, jak również odpowiednio szczegółowy opis metod. Mam uwagę odnoszącą się do spisu plazmidów: wektory stosowane w systemie dwyhybrydowym opisane na stronie 43 powinny raczej znajdować się w części tabeli odpowiadającej wektorom. Jasno określony cel pracy uzupełniony jest celami szczegółowymi odpowiadającymi kolejnym etapom pracy. Rozdział Wyniki przedstawia opis podejścia doświadczalnego do realizacji zaplanowanych celów, a dobre zrozumienie tego rozdziału ułatwiają tytuły podrozdziałów stanowiące wnioski z danego etapu eksperymentów. Większość rycin jest przedstawiona jasno i informatywnie, jedynie mam uwagę do Ryc. 11, gdzie ważne dane dotyczące zakresu konstruktów są mało czytelne, wskutek niewielkich rozmiarów i nagromadzenia informacji. Należy podkreślić szeroki zakres metod stosowanych w pracy przez Doktoranta, dzięki czemu przedstawione wyniki są przekonujące. Na uwagę zasługuje także rozdział Dyskusja, gdzie Pan Koper umiejętnie przedstawia wyniki swojej pracy oraz najważniejsze wnioski na tle badań prowadzonych nad innymi plazmidami z grupy repABC. Oba te rozdziały, wyniki i dyskusja, świadczą o opanowaniu nowoczesnego warsztatu badawczego i dojrzałego podejścia do osiągnięć swojej pracy. W rozprawie cytowanych jest ponad 170 pozycji literaturowych, co świadczy o zapoznaniu się Doktoranta z tematyką badań. Rozprawę zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim, podsumowujące dokonania pracy.

Godne podkreślenia jest, iż rozprawa została napisana poprawnym i zrozumiałym językiem naukowym, z dbałością o prawidłowy szyk zdań i poprawność gramatyczną, co jest istotne dla jakości przekazu informacji. Doktorant umiejętnie i czytelnie przedstawił szeroki zakres metod, analiz i wyników, co w przypadku, gdy przedmiotem badań są plazmidy o dużym stopniu podobieństwa, jest bardzo ważne i wymaga starannego przemyślenia sposobu prezentacji wyników i jasnego jednoznacznego przekazu.

Szkoda, iż w rozprawie nie podany został dorobek publikacyjny Doktoranta. Bazy danych podają informacje o czterech publikacjach, w których Pan Koper jest współautorem. Jedna z tych prac, opublikowana niedawno w *Molecular Microbiology*, jest oparta na wynikach przedstawionych w niniejszej rozprawie (Pan Koper jest jej pierwszym autorem). Opublikowanie

rezultatów pracy doktorskiej w prestiżowym czasopiśmie niewątpliwie świadczy o ich znaczeniu naukowym.

Podsumowując, wartość naukowa pracy doktorskiej Pana Kopera wiąże się ze znaczącym wzbogaceniem wiedzy na temat replikacji i utrzymywania w komórce plazmidów z grupy repABC, rozpowszechnionych wśród bakterii glebowych, oraz - w szerszym kontekście, o mechanizmach powielania pozachromosomalnych elementów genetycznych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Kopera spełnia w sposób zadowalający wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 18.03.2011 o stopniach naukowych i tytułach naukowych zaś dorobek naukowy Doktoranta przedstawiony w rozprawie uzasadnia nadanie mu stopnia naukowa doktora. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Piotra Kopera do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową i walory poznawcze pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

A. Szałowski - Piętn