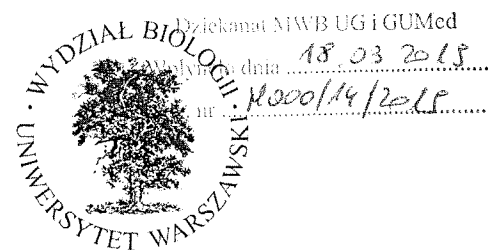




UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej



**Prof. dr hab. Jacek Bielecki**

**Warszawa, 1. 03. 2019.**

**Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Greli „Warianty receptora GerA w przetrwalnikach różnych szczepów laboratoryjnych *Bacillus subtilis*.”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Greli została wykonana w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej Katedry Biotechnologii Medycznej przy Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UGd i GUM. Promotorem pracy jest Pan prof. dr hab. Michał Obuchowski, a promotorem pomocniczym Pan dr Adam Iwanicki. Oceniana rozprawa bardzo mocno wpisuje się w nurt badań realizowanych w Katedrze przez Pana prof. Obuchowskiego, a także Pana dr. Iwanickiego, od dawna związanych z badaniami nad fizjologią tworzenia przetrwalników u *Bacillus subtilis*. Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy nawiązuje więc do badań prowadzonych w Zakładzie. Podjęcie się tematu badawczego dotyczącego molekularnego mechanizmu działania najbardziej znanego receptora kiełkowania GerA było trudnym wyzwaniem, szczególnie ze względu na fakt, iż cechy strukturalne białek podjednostkowych tego białka zostały określone jedynie dotychczas na drodze bioinformatycznej, bez znajomości pełnej przestrzennej struktury białka i wiedzy o wzajemnych oddziaływaniach podjednostek tego białka. Poznanie szczegółowe procesów kiełkowania spor bakteryjnych ma znaczenie aplikacyjne. Przygotowanie i opracowanie nowych skutecznych metod eliminacji spor bakteryjnych w środowisku jest więc istotne pod względem zarówno poznawczym jak i praktycznym. Na początku oceny rozprawy należy też zaznaczyć, że wielki potencjał zastosowań praktycznych czyni pracę bardzo istotną z punktu widzenia biotechnologii medycznej. Szczególne znaczenie ma to dla wykorzystania w leczeniu pewnych i powtarzalnych metod eliminacji spor. Jest to ważne, albowiem spory bakteryjne są czynnikiem wyjściowym wielu zróżnicowanych zakażeń. Z tego powodu konieczne staje się stosowanie precyzyjnych i wiarygodnych metod usuwania spor bakteryjnych. Praca prowadzi do poprawienia stanu wiedzy na temat mechanizmów molekularnych kiełkowania spor na modelowym przykładzie *Bacillus*. Precyzyjnie określony cel pracy czyli znalezienie przyczyny występowania różnic między fenotypami kiełkowania spor dwóch wariantów szczepów *B. subtilis* 168, a także

ocena wpływu elementów podjednostkowych, w tym przypadku GerAA na funkcjonowanie receptora kiełkowania Ger A, został spełniony. Bardzo szczegółowy plan badań prowadzący do uzyskania wyników został konsekwentnie przez doktorantkę zrealizowany. Zrealizowanie celów wytyczonych w pracy wymagało konsekwencji w wykonywaniu kolejnych zadań badawczych. Po przeprowadzonej analizie jakościowej kiełkowania przetrwalników wyizolowane DNA genomowe wybranych szczepów poddano sekwencjonowaniu i analizie porównawczej, po czym oczyszczone przetrwalniki wykorzystano do analizy kinetyki kiełkowania w obecności L-alaniny oraz w oparciu o uwalnianie DPA. Przeprowadzono także analizę polimorfizmu genu gerAA przy pomocy qPCR z analizą HRM. W celu sprawdzenia możliwości przywrócenia możliwości kiełkowania spor przeprowadzono komplementację różnymi wariantami genu gerAA niesionymi przez skonstruowane plazmidy integracyjne. Okazało się, że komplementacja niezdolnego do kiełkowania szczepu 168F wariantem genu gerAA obecnym w szczepach *B. subtilis* 168G i PY 79 prowadzi do zmiany fenotypu kiełkowania. To sugerowało, że za różnice w fenotypie kiełkowania odpowiedzialne są różne allele genu gerAA. Szkoda, że nie udało się eksperyment bezpośrednio wskazujący na te zależności poprzez konkretną komplementację różnymi wariantami genu gerAA szczepu z delecją w gerAA. Dalsze próby przeprowadzono już ze szczepem delecyjnym całego operonu gerA, który poddano komplementacji przez gerAb i gerAC oraz różne warianty alleli gerAA. Uzyskane wyniki stały się kluczem do dalszych konstrukcji i pozwoliły na wstępną ocenę udziału elementów gerAA na proces kiełkowania. Bezpośrednim wynikiem z tych badań był dowód na to, że za proces kiełkowania spor odpowiada reszta aminokwasowa w pozycji 299 białka GerAA. Doktorantka wykazała również, iż obecność proliny w pozycji 302 tego białka (obecna w opisanym elemencie transbłonowym) odpowiada za brak funkcjonalności receptora GerA. Ocena, że reszta 302 faktycznie znajduje się w segmencie transbłonowym potwierdza założenie że bierze ona udział w oddziaływaniach z innymi helisami wchodzącymi w skład przetrwalników bakteryjnych pełniąc funkcję stabilizacji białka GerAA w błonie wewnętrznej spor. Opisany równoległe model homologiczny białka GerAA pozwolił na analizę in silico uzyskanych wyników. Przedstawiona praca doktorska jest typowa dla dysertacji powstających na Wydziale Biotechnologii UGD i GUM. Część wynikowa dysertacji poprzedzona jest bardzo obszernym wstępem, który stanowi kompendium wiedzy na temat procesów kiełkowania u bakterii oraz przeglądu ewentualnych aplikacji wynikających ze znajomości tego procesu. Zaprojektowanie eksperymentów i uzyskanie w wyniku ich realizacji tak wielu wartościowych wyników na pewno świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki. Wykonanie większości eksperymentów wymagało stworzenia wielu konstrukcji genetycznych oraz dobrego przygotowania w tym zakresie. Część eksperymentalna rozprawy pozwoliła na weryfikację wcześniej zakładanych hipotez badawczych.

Opracowanie wektorów, które pozwalają na precyzyjną komplementację to praca żmudna i trudna, wymagająca od doktorantki cierpliwości i konsekwencji działania. Niezbędne powtórzenia eksperymentów obwarowanych licznymi eksperymentami kontrolnymi wymagały wyjątkowego nakładu pracy i precyzji.

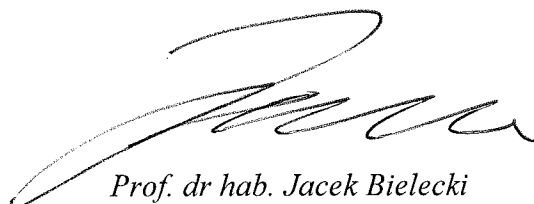
Wszystkie rozdziały dysertacji zapisano na 114 stronach włączając 27 tabel, 35 rycin oraz 2 załączniki. Opisane wyniki połączono z dyskusją. W podsumowaniu zawarto skrót wszystkich osiągnięć uzyskanych w wyniku realizacji badań. Spis literatury jest obszerny, obejmuje 69 pozycji. Oceniana rozprawa doktorska nie zawiera błędów merytorycznych i jest stosunkowo dobrze napisana, aczkolwiek momentami pojawiają się zapisy chaotyczne i elementy mocno skomplikowane (np. tabelki dotyczące porównania parametrów kiełkowania), których sposób zapisu przyczynia się do utrudnienia zrozumienia ilustrowanego zjawiska. Skomplikacja zapisów i konstrukcji tabel nie przyczyniają się do ułatwienia zrozumienia podanej informacji. W wyniku realizacji planu pracy doktorantka uzyskała pewne i powtarzalne wyniki, co było możliwe dzięki świetnemu przygotowaniu i doświadczeniu badawczemu Doktorantki, która jest już współautorką ważnych z punktu widzenia biotechnologii 2 prac eksperymentalnych związanych tematycznie ze sporami *Bacillus subtilis*. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie o znaczeniu międzynarodowym i zawierają wyniki związane z badaniami prowadzonymi w efekcie do uzupełnienia informacji o molekularnych mechanizmach kiełkowania spor u bakterii. W publikacji wydanej w *Plos One* w ubiegłym roku doktorantka jest pierwszym autorem pracy. W pracy tej znajduje się znaczna część wyników opisanych w ocenianej rozprawie doktorskiej. Wcześniejsze współautorstwo w pracy opublikowanej w *Microbial Cell Factories* dotyczy badań nad wektorami warunkującymi prezentację białek w elementach powierzchniowych spor bakteryjnych. Wyniki badań doktorantki były też przedstawiane na kilku krajowych i międzynarodowych zjazdach naukowych, w których doktorantka brała czynny udział. Pani mgr A. Grela jest także współautorem 2 zgłoszeń patentowych, z których pierwsze dotyczy wektorów integracyjnych dla *B. subtilis*, a drugie zastosowania wektorów w celu prezentacji fuzyjnych białek na powierzchni przetrwalników bakteryjnych. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest ciekawie przedstawiona prezentacja wyników wraz z przeprowadzoną dyskusją, podczas której autorka na podstawie uzyskanych wyników sugeruje dobrze podparte pozycjami literatury wnioski prowadzące do wyjaśnienia nowych danych dotyczących mechanizmu kiełkowania spor. Sekwencja opisu została tak skonstruowana, że kolejny eksperyment i jego opis wynika z poprzedniego. Część wynikowa zawiera także opisy wyników bez znaczenia dla dalszej pracy, ale natychmiast są dyskutowane i nowa droga prowadząca do rozwiązania problemu jest proponowana i realizowana. W pracy kolejno przedstawiane są możliwości zastosowania zaplanowanej i stworzonej konstrukcji genetycznej. Umiejętny opis wielu

skomplikowanych procedur, a także proste i logiczne wyjaśnienia, oczywiście w miarę możliwości stosowanych skrótów i procedur, także przyczyniają się do pozytywnej oceny przedstawionej pracy doktorskiej. Przedstawienie wyników i dokumentacja przekonują recenzenta, że postawione wnioski są uprawnione, opisane metody rzeczywiście posiadają walory pozwalające na wyjaśnienie problemu. Jest to ważne ze względu na fakt, iż prezentowana praca doktorska stanowi opis wyników własnych, które, mam nadzieję, niebawem ukażą się w postaci kolejnej publikacji.

Podjęty w pracy problem badawczy jest aktualny i atrakcyjny pod względem naukowym, tym bardziej, że dotychczasowe informacje naukowe dotyczące biologii kiełkowania spor ze względu na trudności metodyczne są niepełne. Należy podkreślić, iż zaprojektowanie i uzyskanie wyników oraz ich pełna interpretacja wymagała dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba przeprowadzonych analiz i liczba wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej jest znaczna. Niewątpliwym jest fakt, iż uzyskane wyniki w ocenianej rozprawie doktorskiej przyczyniają się do poszerzenia naszej wiedzy na temat biologii procesu kiełkowania. Nie ulega także wątpliwości, że ciekawe spostrzeżenia doktorantki mają duże znaczenie aplikacyjne, bo ewentualnie pozwalają na podjęcie strategicznej decyzji o jednoznacznym sposobie zwalczania spor bakteryjnych w środowisku. Innym efektem tych prac o znaczeniu aplikacyjnym może być wykorzystanie tych informacji przy projektowaniu użycia spor *B. subtilis* w roli prezynterów antygenów w ramach badań nad szczepionkami najnowszej generacji. Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr A. Greli daje podstawę do dalszych badań związanych z mechanizmami procesu kiełkowania bakterii. Jednak ze względu na zastosowany sposób prezentacji wyników w pracy zabrakło informacji na ten temat. Doktorantka nie rozważa więc o perspektywach dalszych badań tego typu będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy. Warto byłoby poznać opinię Doktorantki na ten temat podczas obrony pracy doktorskiej.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska mgr Anny Greli spełnia wymagania stawiane współczesnym pracom doktorskim. Dorobek naukowy Kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UGd i GUM o przyjęcie tej dysertacji i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając także duży wkład pracy w rozprawę oraz możliwość dalszego publikowania wyników zawartych w rozprawie wnoszę o stosowne wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Warszawa, 1. 03. 2019r.



Prof. dr hab. Jacek Bielecki