



Prof. dr hab. Jacek Bardowski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Warszawa, 12.09.2019

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR PAULINY JADACKIEJ

„ROLA PRODUKTU GENU *PRO* BAKTERIOFAGA P1 W MORFOGENEZIE WIRIONÓW”
„THE ROLE OF THE P1 BACTERIOPHAGE *PRO* GENE PRODUCT IN MORPHOGENESIS OF THE VIRIONS”

OCENA OGÓLNA

Biologia bakteriofagów stanowi niezwykle interesujące zagadnienie tak teoretyczne, poznawcze, jak i aplikacyjne. Po pierwsze dlatego, że te prokariotyczne mikroorganizmy infekujące komórki bakteryjne, a zaliczane do grupy wirusów, stanowią wraz z innymi wirusami najliczniejszą grupę drobnoustrojów na Ziemi, ocenianą na 10^{31} . Po drugie bakteriofagi są elementem mobilnej puli genów, a uczestnicząc w transferze genów uczestniczą także w ewolucji bakterii i ich adaptacji do środowiska. Po trzecie, z uwagi na cykle rozwojowe, lizogeny lub lityczny, infekcje bakteriofagami mogą powodować konwersję lizogenną bakterii bądź lizę, rozpad komórki bakteryjnej. Wymienione powyżej fakty powodują, że bakteriofagi odgrywają dużą rolę w biotechnologii, farmacji i medycynie, a szczególnym zainteresowaniem wielu ośrodków na świecie jest możliwość wykorzystania fagów w terapii fagowej ludzi i zwierząt zainfekowanych bakteriami wielolekoopornymi.

Powyższe zagadnienia stanowią tematykę badań naukowych Zespołu, kierowanego przez Panią dr hab. Małgorzatę Łobocką, z Samodzielnego Zakładu Biologii Mikroorganizmów SGGW w Warszawie i z Zakładu Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN, która jest Promotorem rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Jadackiej. Badania te stoją na bardzo wysokim poziomie naukowym, o czym świadczą liczne prace Zespołu opublikowane w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, a wyniki prac eksperymentalnych znacząco przyczyniają się do poszerzania wiedzy na temat biologii bakteriofagów oraz ich potencjalnych zastosowań praktycznych.

W tę szeroką tematykę naukową Zespołu prof. M. Łobockiej znakomicie wpisują się badania przeprowadzone przez mgr Paulinę Jadacką, których celem było zidentyfikowanie funkcji biochemicznej i ustalenie roli białka Pro w morfogenezie preglówki bakteriofaga P1. Doktorantka zaproponowała nowatorskie rozwiązanie problemu i zrealizowała z sukcesem założone cele badawcze pracy, wykorzystując szeroki zestaw nowoczesnych metod i technik z obszaru

mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej. Ponadto, wykazała się opanowaniem wybranych narzędzi bioinformatycznych. O istotności i aktualności tematyki naukowej Jej pracy doktorskiej świadczy też liczba 947 publikacji znajdujących w bazie PubMed po wpisaniu hasła „phage morphogenesis”. Jednak jedynie 47 prac opisuje proces morfogenezy preglówki fagów, co pokazuje, że ten proces nie jest wystarczająco udokumentowany i przemawia za bardzo dobrym wyborem tematyki badań Doktorantki. Moim zdaniem do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy:

- 1) Zidentyfikowanie *in silico* białka Pro bakteriofaga P1, jako potencjalnej proteazy o klasycznej strukturze regionu katalitycznego zawierającego triadę aminokwasów His⁵⁷. Ser¹²⁹, Asp¹⁵⁰;
- 2) Nadprodukcja i uzyskanie oczyszczonych preparatów białka Pro oraz jego hipotetycznych substratów – białek gp23 oraz DarA;
- 3) Wykazanie funkcjonalności białka Pro w reakcji enzymatycznej *in vivo*, poprzez udowodnienie jego aktywności proteolitycznej wobec białek gp23 oraz DarA.

Realizacja badań przez Doktorantkę była możliwa dzięki uzyskaniu finansowania z MNiSW, SGGW, Urzędu Marszałkowskiego Województwa Mazowieckiego w Warszawie oraz IBB PAN, co zostało wskazane i sprecyzowane na stronie 9 pracy doktorskiej. Szkoda, że rezultaty badań nie zostały jak dotąd opublikowane, chociaż z rozmowy z Panią Promotor dowiedziałem się, że publikacja taka jest w przygotowaniu.

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Jadackiej jest napisana w języku polskim, liczy 213 stron, ma typowy układ edytorski i obejmuje: Streszczenie w języku polskim i angielskim – 2 strony, Spis treści – 4 strony, Wykaz stosowanych skrótów – 2 strony, Przegląd literatury – 27 stron, Cel pracy – 1 strona, Materiały – 17 stron, Metody – 32 strony, Wyniki – 48 stron, Dyskusja – 21 stron, Podsumowanie – 2 strony, Bibliografia – 28 stron, Materiały uzupełniające – 19 stron. Praca doktorska zawiera także wymagane oświadczenia i zgody Doktorantki oraz podziękowania.

Praca doktorska jest napisana zasadniczo klarownie, a zagadnienia opisane zarówno w Wynikach, jak i we Wstępie oraz Dyskusji są bogato ilustrowane rysunkami i tabelami. Jednak Doktorantka nie ustrzegła się od popełnienia szeregu drobnych błędów edytorskich, dotyczących tekstu pracy jak i rysunków (fotografii), które zaznaczyłem w tekście pracy przekazany jej do wglądu. Te niedociągnięcia edytorskie nie wpływają w istotny sposób na wartość naukową pracy doktorskiej przedstawionej mi do recenzji.

OCENA SZCZEGÓŁOWA

Przegląd literatury jest dobrze przedstawionym i aktualnym przeglądem światowego piśmiennictwa naukowego dotyczącego tematyki morfogenezy preglówek bakteriofagów.

Omówione dane stanowią dobrą bazę do przygotowania opracowania monograficznego, będąc jednocześnie rzetelnym źródłem referencji.

Cel Pracy jest jasno określony i nie zgłaszam do niego żadnych uwag.

Materiały i Metody to rozdział szczegółowo opisujący użyte techniki i procedury eksperymentalne, który jest dobrym źródłem informacji dla tych, którzy chcieliby wykorzystać opisane metody we własnej pracy badawczej. Liczne ilustracje w postaci rysunków i tabel ułatwiają czytelnikowi zrozumienie zawartych tam informacji. Rozdział ten świadczy również o bogactwie użytych technik eksperymentalnych, ich właściwym doborze dla realizacji założonych celów badawczych oraz o ich dobrym opanowaniu przez Doktorantkę.

Wyniki zawierają w miarę jasny i pełny opis obserwacji eksperymentalnych i są dobrze udokumentowane i przedstawione. Bardzo mi się podoba materiał faktograficzny, przedstawiony w postaci tabel i rysunków. Autorka wykazała się dobrym opanowaniem różnorodnych technik badawczych, takich jak: klasyczne techniki mikrobiologiczne, biochemiczne metody preparatywne i analityczne, metody biologii molekularnej. Analiza wyników przeprowadzonych doświadczeń jest poprawna, a wyciągane wnioski w pełni uprawnione. Mam uwagę do rozdziału V.1.5 opisującego wpływ inaktywacji genu *pro* na skład białkowy wirionów faga P1. W opisanych w tym rozdziale wyników badań Doktorantka udowadnia, że białko Pro faga P1 hydrolizuje 3 substraty – białka gp23, DarA i DdrB, potwierdzając wcześniejsze obserwacje i sugestie innych członków Zespołu prof. M. Łobockiej. To jeden z kluczowych i najciekawszych rozdziałów pracy doktorskiej, a wyniki eksperymentów w nim opisane stanowiły podstawę do dalszych badań opisanych w następnych rozdziałach. Argumentacja Doktorantki byłaby dużo bardziej klarowna i nie pozostawiała pola na zarzuty, gdyby jakość rysunków V.6 i V.7 była lepsza i gdyby Autorka dołączyła tabelkę, która powiązywałaby numerację prążków z pochodzeniem peptydów zidentyfikowanych przy użyciu techniki spektrometrii mas. A ponadto, gdyby Doktorantka wskazała na różnice pomiędzy wirionami bakteriofaga P1, a jego mutantów w tej tabelce. W dalszej części rozdziału Wyniki opisane są badania nad tylko 2 białkami substratowymi dla białka Pro – gp23 i DarA – oraz samym białkiem enzymatycznym Pro.

Mam więc pytanie do Doktorantki. Co było powodem rezygnacji z badań nad białkiem DdrB?

Dyskusja przedstawia klarowne i krytyczne omówienie uzyskanych wyników, a Doktorantka często odnosi wyniki obserwacji własnych do danych literaturowych, raz jeszcze wykazując się bardzo dobrą znajomością tematu. I z zadowoleniem odnotowuję, że pomimo ograniczonych badań własnych nad białkiem DdrB, Doktorantka w tej części pracy "nie porzuciła" tego białka całkowicie, ale włączyła do swoich naukowych dywagacji.

Na zakończenie mojej recenzji chciałbym postawić Doktorantce jeszcze dwa pytania:

- 1) Czy możliwe są inne funkcje białka Pro niż funkcja proteolityczna?
- 2) Jakie inne hipotezy, poza wysnutymi w pracy, mogłaby Doktorantka zaproponować w celu wytłumaczenia obserwacji, że mutanty bakteriofaga P1 z nieaktywnym białkiem Pro są zdolne do spowodowania lizy komórek bakteryjnych?

KONKLUZJE RECENZJI

Reasumując stwierdzam, że przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską mgr Pauliny Jadackiej oceniam bardzo pozytywnie i uważam, że spełnia ona całkowicie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Moje uwagi w większości dotyczą mało istotnych merytorycznie usterek technicznych i redakcyjnych. Doktorantka zaproponowała nowatorskie rozwiązanie problemu i zrealizowała w pełni postawione przed nią cele naukowe, przy zastosowaniu wielorakich podejść badawczych oraz różnorodnych technik i metod z zakresu mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej oraz bioinformatyki.

W związku z powyższym, stawiam wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Pauliny Jadackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

