

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Jadackiej pt. „Rola produktu genu *pro* bakteriofaga P1 w morfogenezie wirionów”

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Jadackiej, wykonana pod kierunkiem Pani dr. hab. Małgorzaty Łobockiej, prof. SGGW, jest mocno osadzona w uprawianej od wielu lat mikrobiologicznej tematyce Samodzielnego Zakładu Biologii Mikroorganizmów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Szkole tej można przypisać co najmniej dwa wyróżniki. Pierwszy, to wieloletnie zainteresowania bakteriofagami czyli wirusami bakteryjnymi. Drugi zaś, to solidna i konsekwentna metodologia badawcza.

Przedmiotem badań Doktorantki jest określenie roli produktu genu *pro* w morfogenezie faga P1, który obok bakteriofagów λ i T4 należy do fagów najlepiej poznanych pod względem biologii molekularnej. Jest to fag infekujący *Escherichia coli* i inne bakterie jelitowe, który utrzymywany jest w lizogenach jako stabilny niskokopijny plazmid.

Recenzowana praca napisana jest według tradycyjnego układu prac doktorskich i zawiera wszystkie formalnie wymagane części, tj.: przegląd literatury, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, bibliografia, materiały uzupełniające dotyczące między innymi składu białkowego wirionów mutantów faga P1 z inaktywowanym genem *pro* i faga P1 typu dzikiego, składu aminokwasowego procesowanej i nieprocesowanej formy białka DarA i białka gp23 oraz zamieszczone na początku rozprawy doktorskiej krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim jak i też wykaz stosowanych skrótów. Cała praca liczy 212 stron.

Podjęcie się przez Doktorantkę badań dotyczących roli produktu genu *pro* w morfogenezie faga P1 uważam za zadanie ważne nie tylko ze względów poznawczych, ale i potencjalnie praktycznych.

Przegląd literatury, poprzedzony jest krótkim wstępem dotyczącym dojrzewania preglówek fagów ogonkowych. U podstaw zrozumienia molekularnych mechanizmów składania i dojrzewania wirionów leży, jak pisze Doktorantka, poznanie wzajemnych oddziaływań między głównymi białkami struktury, białkami tworzącymi rusztowanie, białkami kompleksu portalu, a także białkami odpowiedzialnymi za wyrzut materiału genetycznego wirusa podczas infekcji gospodarza. W pierwszym podrozdziale mgr Paulina Jadacka przedstawiła inicjację procesu dojrzewania preglówek fagów i zwróciła uwagę na trzy zaproponowane możliwe scenariusze dojrzewania preglówek wirionów, tj. 1. Z inicjacją procesu dojrzewania z udziałem białka portalu, 2. Bez udziału białka

portalu w inicjacji procesu składania wirionów, ale z ich dołączaniem do preglówki w późniejszym etapie, 3. Z inkorporacją białka portalu w końcowym procesie formowania preglówki.

W drugim podrozdziale Doktorantka omówiła rolę błony komórkowej gospodarza w morfogenezie preglówek fagów. Przypuszcza się bowiem, że związanie białka portalu gp20 faga T4 z błoną komórkową rozpoczyna proces dojrzewania preglówek fagowych, jakkolwiek dopuszcza się, że warunkiem inicjacji tego procesu nie musi być bezpośredni kontakt białka portalu z błoną komórki.

Przedstawiając rolę białek komórkowych warunkujących prawidłową morfogenezę preglówek fagów podkreśliła, że aktywność białek operonu *groE* jest niezbędna w morfogenezie jedynie u niektórych fagów. Krótko scharakteryzowała udział białek rusztowania w morfogenezie fagów podkreślając ich wysoką specyficzność, która w większości przypadków ograniczona jest do jednego typu struktury. W kolejnym rozdziale przeglądu literatury Doktorantka przedstawiła klasyfikację białek rusztowania ze względu na ich lokalizację i kształt formowanego kapsydu. Białka te mogą brać udział w określaniu kształtu i rozmiaru dojrzewającej główki. Opisała klasyfikację endoproteaz biorących udział w morfogenezie preglówek bakteriofagów, która opiera się na dwóch współistniejących systemach, zaproponowanych przez Komisję Enzymów (EC) i MEROPS; omówiła główne białka główki zaznaczając, że większość fagów do budowy wirionów wykorzystuje tylko jeden typ białka strukturalnego, opisała stabilizację ścian kapsydu przez umieszczone na jego powierzchni, tzw. białka dekorujące, fagowe proteazy preglówki jako narzędzie dla przemysłu biotechnologicznego, które mogą być wykorzystane do oczyszczania rekombinowanych białek, a w ostatnim podrozdziale przedstawiła nietypowe aspekty procesu morfogenezy modelowego faga P1, który może tworzyć główki o trzech typach morfologicznych. Doktorantka podkreśliła, że plazmidy utworzone na bazie faga P1 posłużyły do konstrukcji wektorów do klonowania dużych fragmentów DNA, a rekombinaza Cre faga P1 jest cennym narzędziem biotechnologicznym wykorzystywanym w inżynierii genomów bakteryjnych *in vivo*. Wskazała również, że mutacje o warunkowo letalnym fenotypie, powodujące niezdolność do procesowania prekursora DarA, dotyczą genu *pro* co sugeruje, że białko Pro uczestniczy w proteolizie DarA, a także może pełnić inną funkcję, niezbędną dla litycznego rozwoju faga P1.

Cele pracy, opisane przez Doktorantkę w kolejnym rozdziale, zostały sformułowane jasno i uważam je za poważne wyzwanie naukowe, gdyż ich realizacja nie była zadaniem łatwym i wymagała przeprowadzenia wielu różnych badań z użyciem różnych specjalistycznych technik.

Rozdział „Metody” został podzielony na 9 podrozdziałów, w których mgr Paulina Jadacka przedstawiła w formie tabel materiał badawczy, tj. szczepy *E. coli*, szczepy drożdżowe *Pichia pastoris*, plazmidy bakteryjne i drożdżowe, spośród których wiele było skonstruowanych przez Doktorantkę, oligonukleotydy, podłoża hodowlane, skład wykorzystywanych buforów i roztworów, wzorce mas cząsteczkowych DNA i białek oraz oprogramowania wykorzystywane podczas analiz bioinformatycznych.

W rozdziale „Metody” Pani Paulina Jadacka opisała preparatykę DNA plazmidowego z komórek *E. coli*, DNA chromosomalnego z *P. pastoris*, trawienie DNA restryktazami, ligację, przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* i *P. pastoris*, transformację komórek *E. coli* i *P. pastoris*, elektroforezę DNA w żelu agarozowym i elucję DNA z żelu, amplifikację DNA metodą PCR, konstrukcję plazmidów ekspresyjnych i rekombinacyjnych niosących zmodyfikowane formy wybranych genów faga P1, konstrukcję wektorów rekombinacyjnych niosących zmodyfikowane formy genu *pro* faga P1, nadprodukcję rekombinowanego białka Pro faga P1 w systemie pColdIII, nadprodukcję rekombinowanego białka Pro faga P1 w systemie pET, nadprodukcję rekombinowanych białek gp23 i DarA faga P1 w systemie ekspresyjnym pDM1.1, nadprodukcję rekombinowanego białka Pro faga P1 w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*, oczyszczanie białek rekombinowanych faga P1 w warunkach niedenaturujących, przygotowanie próbek białkowych pozyskiwanych ze szczepów *E. coli* i szczepów drożdżowych *P. pastoris* do elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, elektroforezę białek w denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE), elektrotransfer białek z żeli poliakrylamidowych na filtr nitrocelulozowy, wykrywanie białek z etykietą histydynową na filtrze nitrocelulozowym z wykorzystaniem przeciwciała anti-(His)₆, monitorowanie proteolizy substratów genu *pro* faga P1 w komórkach *E. coli*, badanie retencji plazmidów pPJA1, pPJA2, pPJA3 w komórkach szczepów BL21, BL21 pLysS, C43, wyznaczenie krzywych wzrostu *E. coli*, oznaczenie miana fagów metodą dwuwarstwową, indukcję litycznego rozwoju faga P1c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* i jego pochodnych, lizogenezację komórek *E. coli* fagiem P1 c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* i jego pochodnymi, precypitację fagów z lizatu, oczyszczanie fagów poprzez wirowanie w 0.1 M octanie amonu, konstrukcję mutantów faga P1c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* z insercyjnie zinaktywowanym genem *pro*, komplementację mutacji genu *pro* faga P1 przez gen *pro* sklonowany w plazmidzie, wizualizację fagów z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, sekwencjonowanie DNA i identyfikację białek przy udziale spektrometrii mas.

Chcę nadmienić, że wszystkie techniki badawcze zostały szczegółowo opisane i dobrze dobrane do realizacji celów pracy. Dokładny i klarowny opis metod badawczych zawsze pochwalam gdyż takie podejście ułatwia interpretację wyników. Na uwagę i pochwałę zasługują również własnoręcznie przygotowane przez Doktorantkę schematy prezentujące konstrukcję plazmidów ekspresyjnych i rekombinacyjnych, które były wykorzystane w badaniach.

W kolejnym rozdziale „Wyniki”, mgr Paulina Jadacka jasno i szczegółowo omówiła wszystkie uzyskane wyniki i zamieściła je na 47 stronach, proporcjonalnie do wielkości zadania. Zostały one nie tylko dobrze opisane, ale także klarownie przedstawione na rysunkach i w tabelach. Pierwszy etap badań dotyczył konstrukcji pochodnych faga P1 c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* ze zinaktywowanym genem *pro* poprzez insercję kasety niosącej gen oporności na kanamycynę. W tym celu Doktorantka wykorzystwała rekombinację homologiczną, w wyniku której doszło do wymiany między odpowiadającymi sobie fragmentami genu *pro* zinaktywowanego kasetą kanamycynową

obecnego na plazmidzie pPBE1, a jego niezmutowaną wersją w genomie faga P1. Doktorantka ustaliła następnie, w oparciu o wielkość fragmentów DNA plazmidu pPBE1 trawionego enzymami restrykcyjnymi XhoI i BstXI, że kierunek transkrypcji kasety oporności na kanamycynę zrekombinowanej w genom faga P1 jest zgodny z kierunkiem transkrypcji zinaktywowanego przez nią genu profaga.

Drugim wątkiem recenzowanej pracy była identyfikacja pochodnych faga P1 c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* z inaktywowanym genem *pro*. W tym celu Doktorantka, po wprowadzeniu do komórek szczepu N99/P1 c1-100 *mod749::IS5 IS1::Tn9* plazmidu pPBE1 z kasetą kanamycynową i zainicjowaniu procesu rekombinacji, lizogenizowała fagami uzyskanego lizatu komórki *E. coli* C600 i selekcjonowała metodą replik podwójne rekombinanty, które nie zawierały plazmidu zintegrowanego z genomem P1, a zawierały w genomie faga P1 jedynie kasetę oporności na kanamycynę. Poprawność insercji kasety oporności na kanamycynę do genu *pro* badanego faga P1, Pani Paulina Jadacka potwierdziła na podstawie wielkości amplikonów (3656 bp) uzyskanych w reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do genów *prt* i *lyz* flankujących gen *pro*.

Za ważny element badań Doktorantki uważam określenie wpływu inaktywacji genu *pro* na rozwój lityczny faga P1 c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9*. Mgr Paulina Jadacka wykazała, że brak produktu genu *pro* nie wpływa na zdolność faga P1 do powodowania lizy komórki po termicznej indukcji litycznego rozwoju profaga. Wykazała także, że badane rekombinanty faga P1 nie były zdolne do lizogenizacji wrażliwych komórek ani do tworzenia łysinek na warstwie komórek szczepów wrażliwych na faga P1.

W oparciu o analizę morfologii fagów P1 ze zinaktywowanym genem *pro*, w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, udokumentowała udział białka Pro tego faga w kształtowaniu właściwej morfologii wirionów. Wykazała bowiem i zaprezentowała na bardzo ładnych zdjęciach, że wiriony mutantów to główki pozbawione ogonków i ogonki układające się w struktury zwane poliogonkami, a zatem oddzielone od siebie struktury wirionu niezdolne do infekcji wrażliwych komórek bakteryjnych.

Za ważne zadanie badawcze uważam również analizę wpływu inaktywacji genu *pro* na skład białkowy wirionów faga P1 c1-100 *mod749::IS5IS1::Tn9* w oparciu o skład peptydowy potencjalnych substratów białka Pro faga P1 typu dzikiego oraz mutantów ze zinaktywowanym genem *pro* (białek gp23, DarA i DarB) określonym przy użyciu spektrometrii mas (LC-MS-MS/MS) oraz analizę MASCOT. Analiza składu peptydowego potencjalnych substratów proteazy Pro faga P1 typu dzikiego i zmutowanego wykazała, że mutanty nie są zdolne do procesowania białek gp23, DarA i DarB, które są substratami proteazy Pro.

Aby uzyskać proteazę Pro w aktywnej formie, Doktorantka opracowała metodę jej nadprodukcji umożliwiającą redukcję toksycznego wpływu białka Pro na komórkę gospodarza. Pani Paulina Jadacka w tym celu skonstruowała plazmid ekspresyjny pPBE3 niosący zrekombinowany gen *pro* faga P1, wzbogacony o sekwencję kodującą znacznik polihistydynowy, pod kontrolą promotora genu *cspA*, którego produkt jest głównym białkiem zimnego szoku u *E. coli*. Aby uzyskać

maksymalną indukcję ekspresji genu *pro*, Doktorantka, oprócz obniżenia temperatury hodowli bakterii (15°C) dodała do podłoża hodowlanego IPTG co uzupełnia system pCold w niezależny element regulacyjny oparty na działaniu operonu laktozowego. W wyniku transformacji komórek TOP 10 i KRX mieszaniną ligacyjną (strawiony enzymami BamHI i HindIII plazmid pColdIII oraz plazmid pBE2) Doktorantka uzyskała niewielki odsetek klonów z pożądaną wstawką. Rekombinowane białko próbowała nadprodukować w komórkach *E. coli* BL21 Pro-(His)₆. Niestety, metodą immunodetekcji z przeciwciałami pierwszorzędowymi przeciwko znacznikowi polihistydynowemu, Doktorantka nie zidentyfikowała białka Pro-(His)₆ wśród białek komórek zawierających plazmid pPBE3.

Mgr Paulina Jadacka do badania nadprodukcji białka Pro wykorzystała również drożdżowy system *Pichia pastoris*, który polega na dołączeniu do końca 5' klonowanego genu, DNA, który koduje sygnał sekrecyjny (sekwencja liderowa czynnika koniugacyjnego α -Mf drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) umożliwiający wydzielanie na zewnątrz produktu fuzji białka z peptydem sekrecyjnym. Doktorantka, aby wprowadzić gen *pro* do genomu *P. pastoris* KM71H, skonstruowała plazmid pPBE4 (pochodna plazmidu pPICZ α A), w którym gen *pro* jest pod kontrolą promotora genu oksydazy alkoholowej *AOX1*. Niestety, w żadnym z uzyskanych integrantów *P. pastoris*, Pani Paulina Jadacka nie stwierdziła sygnału świadczącego o obecności białka α Mf-(His)₆-Pro stosując metodę immunodetekcji z przeciwciałami pierwszorzędowymi przeciwko znacznikowi polihistydynowemu na filtrze nitrocelulozowym. W celu weryfikacji czy mimo syntezy α Mf-(His)₆-Pro w komórkach *P. pastoris* nie dochodzi do degradacji α Mf-(His)₆-Pro przez proteazy zewnątrzkomórkowego pochodzenia, hodowlę drożdży wzbogacano o hydrolizat kazeiny. Niestety, i tym razem Doktorantka nie stwierdziła produkcji białka α Mf-(His)₆-Pro. Produkcji α Mf-(His)₆-Pro mgr Paulina Jadacka nie wykazała również metodą chromatografii cieczowej połączonej z spektrometrią mas, kiedy białka frakcji pozakomórkowej z hodowli integrantów rozdzieliła w 10% żelu poliakrylamidowym, a fragmenty żelu z białkami o masie cząsteczkowej zbliżonej do masy α Mf-(His)₆-Pro poddała trawieniu trypsyną.

Kolejne ważne i trudne zadanie podjęte przez Doktorantkę to nadprodukcja białka Pro z wykorzystaniem pochodnej plazmidu pET (pPJA1). Plazmid ten wprowadzono do komórek szczepów BL21 i BL21/pLysS *E. coli*. Do uzyskania nadekspresji genu *T7tag-pro-(His)₆*, mgr Paulina Jadacka zastosowała, zgodnie z zaleceniami producenta systemu pET, standardową procedurę, a więc temperaturę hodowli bez induktora jak i z induktorem (IPTG) wynoszącą 37°C i stężenie: karbanicyliny 50 μ g/ml, chloramfenikolu 30 μ g/ml, glukozy 0.2%, IPTG 0.5 mM. Wśród białek komórek zawierających plazmid pPJA1, w różnym czasie po indukcji ekspresji genu *T7tag-pro-(His)₆*, Doktorantka nie wykazała obecności białka *T7tag-pro-(His)₆* stosując przeciwciała przeciwko znacznikowi polihistydynowemu, czego przyczyną, jak udokumentowała to Pani Paulina Jadacka, była utrata plazmidu pPJA1 we wszystkich komórkach po indukcji co może wiązać się, z toksycznością produktu genu *T7tag-pro-(His)₆*. Doktorantka zmodyfikowała warunki hodowli bakterii co istotnie zmniejszyło utratę plazmidów pPJA1 przez komórki i wykazała, że poprawa retencji

plazmidu pPJA1 w komórkach *E. coli* BL21 umożliwiła identyfikację białka T7tag-Pro-(His)₆. Z faktu identyfikacji białka T7tag-Pro-(His)₆ jedynie w komórkach zawierających plazmid pPJA1 i plazmid pLysS (z genem kodującym amidazę faga T7 hamującą aktywność polimerazy RNA faga T7), w których retencja plazmidu pPJA1 jest większa niż w komórkach tylko z plazmidem pPJA1, mgr Paulina Jadacka wywnioskowała, że obniżenie ekspresji genu *T7tag-pro-(His)₆* w komórkach zawierających plazmid pPJA1 w połączeniu z większą liczbą tych komórek powoduje większą produkcję białka T7tag-pro-(His)₆. (str 121).

Bardzo ważnym wątkiem recenzowanej pracy była weryfikacja funkcjonalności fizjologicznej białka Pro ze znacznikiem polihistydynowym, produkowanego na matrycy genu sklonowanego w plazmidzie. W tym celu Doktorantka zbadła czy dziki gen *pro* sklonowany w plazmidzie komplementuje funkcję genu *pro* mutantu faga P1 c1-100 *mod749::IS5 IS1::Tn9 pro::kan^R*. Mgr Paulina Jadacka wprowadziła do komórek *E. coli* BL21 i BL21/pLysS z plazmidem pPJA1 (*T7tag-pro-(His)₆*) DNA fagowych klonów mutantów P1 c1-100 *mod749::IS5 IS1::Tn9 pro::kan^R* metodą elektroporacji. Aby sprawdzić funkcjonalność nadprodukowanego z plazmidu pPJA1 białka Pro Doktorantka infekowała oczyszczonymi lizatami komórki *E. coli* C600, a insercję kasety kanamycynowej w genie *pro* mutantów w zlizogenizowanych nimi komórkach *E. coli* C600 potwierdziła poprzez jej amplifikację metodą PCR. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wyraźnie wykazały, że mutanty P1 z insercyjnie zinaktywowanym genem *pro*, po namnożeniu w komórkach szczepu C600, produkującego białko Pro, były zdolne do infekcji dzięki komplementacji mutacji w genie *pro* przez gen obecny na plazmidzie. Dane te potwierdziły także funkcjonalność fizjologiczną białka Pro zakodowanego na plazmidzie pPJA1.

Kolejny ważny problem badawczy to opracowanie metody otrzymywania substratów proteazy Pro co stanowi istotny element badań nad systemem proteolitycznego procesowania białek preglówki faga P1 w układzie niezależnym od bakteriofaga. Doktorantka skonstruowała plazmidy zawierające geny 23 oraz *DarA* faga P1 wzbogacone o sekwencję kodującą znacznik polihistydynowy w oparciu o ekspresyjny wektor pDM1.1. Plazmidowe DNA Doktorantka przeniosła do komórek *E. coli* C600, a następnie plazmidy z wstawką o poprawnej sekwencji przeniosła do komórek ekspresyjnego szczepu C43 i badała optymalną temperaturę hodowli bakterii oraz optymalny czas, od indukcji ekspresji genów sklonowanych w plazmidach, do uzyskania wydajnej syntezy białka gp23-(His)₆ oraz *DarA*-(His)₆.

Ostatnie zadanie badawcze, którego podjęła się Doktorantka to analiza aktywności proteolitycznej T7tag-Pro-(His)₆ w komórkach produkujących potencjalne substraty tej proteazy, ale pozbawione innych białek faga P1. W tym celu, mgr Paulina Jadacka do komórek *E. coli* C43 zawierających plazmid z genem *T7tag-pro-(His)₆* (pPJA1) wprowadziła plazmidy z genami kodującymi potencjalne substraty proteazy Pro: pPJA2 - gp23-(His)₆ i pPJA3 - *DarA* - (His)₆ i badała

czy w komórkach syntetyzujących substraty białka Pro zachodzi ich proteolityczne procesowanie. Proteolityczne procesowanie substratów proteazy Pro Doktorantka potwierdziła na podstawie ich przewidywanej ruchliwości elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym jak i analizy sekwencji peptydów oczyszczonych białek stosując spektroskopię mas (LC-MS-MS/MS). Uzyskane przez Panią Paulinę Jadacką wyniki jednoznacznie wykazały, że białko Pro-(His)₆ zdolne jest do proteolitycznego procesowania białek gp23 i DarA bez udziału innych białek faga P1. Poprzez porównanie otoczenia sekwencji trawionych przez proteazę Pro substratów (E*SV-gp23, E*SV-DdrB, E*AI-DarA) Doktorantka zaproponowała prawdopodobne motywy sekwencji, w obrębie których zachodzi hydroliza wiązania peptydowego przez proteazę Pro i wykazała, że obecność reszty kwasu glutaminowego w rozpoznawanym przez proteazę Pro motywach ESV, EAI jest cechą dla nich charakterystyczną.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały omówione w rozdziale „Dyskusja” na tle dostępnych danych głównie z najnowszej, ale też i starszej literatury przedmiotu. Rozdział ten napisany jest bardzo dojrzałe i komunikatywnie, a jego lektura nie pozostawia wątpliwości, że mgr Paulina Jadacka bardzo dobrze zna aktualny stan wiedzy w zakresie prowadzonych badań. Doktorantka wszechstronnie i niezwykle rzeczowo konfrontuje wyniki własne z danymi z literatury. Chce podkreślić, że Pani Paulina Jadacka zamieściła w rozdziale „Dyskusja” informację o sklasyfikowaniu białka Pro faga P1 do klanu peptydaz SH zgodnie z klasyfikacją MEROPS w oparciu o analizę informatyczną sekwencji aminokwasowej białka Pro, w którym zidentyfikowała motywy z resztą histydynową (YGHGR) w pozycji 55-59 i resztą serynową (GWSWA) w pozycji 67-72, które są charakterystyczne dla klanu peptydaz SH. Ponadto, Doktorantka na podstawie analizy informatycznej sekwencji aminokwasowej proteazy Pro wykazała podobieństwo struktury tej proteazy do proteazy gp21 faga T4. I w tym momencie mam pytanie do Doktorantki, dlaczego te ważne informacje wynikające z własnych badań, dotyczące klasyfikacji białka Pro i jego struktury, nie zostały zamieszczone w rozdziale „Wyniki”. Na koniec chcę podkreślić, że z „Dyskusji” jednoznacznie wynika jak ważne zadanie poznawcze zostało podjęte w pracy doktorskiej przez Doktorantkę i jak ogromnie złożone są problemy badane przez Panią Paulinę Jadacką.

Rozprawę kończy wspomniane wcześniej „Podsumowanie”, „Bibliografia” oraz „Materiały uzupełniające”. Żaden z tych rozdziałów nie budzi moich zastrzeżeń. „Podsumowanie” uzyskanych wyników wyraźnie wskazuje na duże znaczenie poznawcze przeprowadzonych badań. Chcę podkreślić, bardzo dobrze wykonane i użyteczne dla recenzenta schematy konstrukcji plazmidów zamieszczone w rozdziale „Metody” i „Wyniki”, a także schematy np. organizacji genów w module odpowiedzialnym za dojrzewanie kapsydów fagów ogonkowych czy też np. dotyczące struktury proteazy Pro faga P1 i proteazy gp21 faga T4 zawarte w rozdziale „Dyskusja”.


Druga moja uwaga zawiązana z recenzowaną rozprawą doktorską dotyczy rozdziału „Streszczenie”, w którym bardzo krótko, moim zdaniem zbyt skrótowo, przedstawiła najważniejsze uzyskane wyniki. Chcę podkreślić, że rozdział ten Pani Paulina Jadacka zakończyła słuszną refleksją, że proteaza Pro, która do swojej aktywności nie wymaga wolnych końców jest „atrakcyjnym narzędziem biotechnologicznym np. do oczyszczania rekombinowanych białek”. Rozdział „Bibliografia” jest opracowany starannie, a zgromadzona literatura została umiejętnie wykorzystana w rozdziale „Przegląd literatury” i „Dyskusja”. Chcę jeszcze nadmienić, że całą pracę doktorską, Pani Paulina Jadacka poprzedziła informacją o finansowaniu badań.

Reasumując stwierdzam, że szeroko zakrojone i niezwykle pracochłonne badania zostały przeprowadzone prawidłowo pod względem metodycznym. Tak wykonane badania uwiarygodniają uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski, a ich niewątpliwe znaczenie poznawcze z pewnym aspektem aplikacyjnym jest niezwykle ważne.

Wniosek końcowy

Mając na uwadze przedstawione dane dotyczące formalnej, metodycznej i merytorycznej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Jadackiej pt. „Rola produktu genu *pro* bakteriofaga P1 w morfogenezie wirionów” stwierdzam, że rozprawa ta stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi nowe dane do nauki. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością wykorzystania nowoczesnych technik badawczych i bardzo dużą konsekwencją w realizacji założonych celów.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska mgr Pauliny Jadackiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Jadackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny i metodyczny ocenianej rozprawy oraz bardzo staranne i przejrzyste opracowanie uzyskanych wyników i całej rozprawy doktorskiej, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej mgr Pauliny Jadackiej stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. Wanda Małek