

Gdańsk, 05.05.2017r

prof. dr hab. Michał Obuchowski
Zakład Bakteriologii Molekularnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Dębinki 1
80-211 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Emilii Murawskiej
zatytułowana
„Struktura genomu i entomopatogenność szczepu *Bacillus thuringiensis* IS5056”

Rozprawa mgr Emilii Murawskiej dotyczy dwóch zagadnień związanych z różnymi nurtami badań organizmów żywych. Pierwszy z nich, badania podstawowe, skupia się na poznaniu złożoności organizmów żywych, a w przedstawionej pracy dotyczy organizacji materiału genetycznego bakterii *B. thuringiensis* IS5056. Drugi nurt, badania stosowane, dotyczy wykorzystania naturalnych właściwości, w tym wypadku bakterii, tak, aby stały się przydatne w szeroko rozumianej działalności człowieka i skupia się na analizie potencjału owadobójczego wymienionego powyżej szczepu bakterii.

Prowadzenie badań podstawowych jako takich, jest powodowane przeważnie ciekawością badaczy oraz chęcią zrozumienia otaczającego ich świata, także niewidocznego gołym okiem, jak w tym wypadku. Bakterie z gatunku *B. thuringiensis* stanowią ciekawy i potencjalnie użyteczny model badawczy z powodu pewnego „rozproszenia” ich genomu na wiele replikonów potocznie zwanych chromosomem i plazmidami. Prowadzone prace badawcze, prócz poznania analizowanego organizmu modelowego mogą przynieść również inne wymierne korzyści. Do wiedzy powszechnej można chyba zaliczyć już fakt wzrostu lekooporności bakterii chorobotwórczych. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko jest ekspansja małych, autonomicznie replikujących się cząsteczek DNA – plazmidów. Zrozumienie zasad przekazywania, a przede wszystkim utrzymywania wielu plazmidów w komórkach bakteryjnych powinno pomóc zrozumieć, przynajmniej w części, również podstawy zjawiska lekooporności.

Rzecz o rozwoju badań stosowanych jest wywołany rozwojem cywilizacyjnym człowieka, który w tym wypadku łączyłbym z rolnictwem. Początki planowanej uprawy roślin można odnaleźć w neolicie, kiedy to rosnące umiejętności w gromadzeniu zapasów żywności pozwoliły na porzucenie nomadycznego trybu życia na rzecz osiadłego. Od tego momentu również można datować zmagania się człowieka z naturą, gdyż uprawa roślin jest mniej lub bardziej związana z monokulturami, które nie mają miejsca w środowisku naturalnym. Problem ten, można powiedzieć, jest nie rozwiązany od 12 000 lat, a wysiłki człowieka aby tego dokonać stają się coraz bardziej wyrafinowane. Tworzenie nowych odmian roślin posiadających nowe cechy wprowadzone metodami inżynierii genetycznej umożliwia coraz to efektywniejsze wykorzystanie nieprzebranych zasobów natury tak, aby chronić nasze uprawy przy użyciu sposobów oferowanych przez samą naturę. Jednym z bardziej znanych osiągnięć jest otrzymanie wielu gatunków roślin uprawnych zwanych „Bt” wykorzystujących toksyny

MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII UG i GUMed

ul. Antoniego Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

tel. +48 58 523 63 20, fax. +48 58 523 64 30, e-mail: dziekanat@biotech.ug.edu.pl



UNIwersytet GDAŃSKI



bakteryjne w celu ochrony przed owadami. Niestety, układ roślin uprawna – szkodnik jest dynamiczny, co zmusza ludzi do bezustannego modyfikowania sposobów ochrony monokultur tak aby być przynajmniej „krok przed” szkodnikami. W ten nurt wpisuje się drugi aspekt recenzowanej rozprawy doktorskiej – analiza etomopotagenności badanego szczepu bakterii.

Przedstawiona do oceny praca jest opracowaniem oryginalnym opisanym na 120 stronach maszynopisu podzielona na klasyczne części. Rozprawa zawiera 22 ryciny i 11 tabel.

Części wstępne

Znajdujemy tutaj spisy treści, tabel i rycin, których obecność jest przydatna przy analizie pracy. Moją uwagę zwrócił tytuł ryciny 4 ct. „Zdjęcie elektronowego szczepu.....”. Z zainteresowaniem odszukałem wspomnianą rycinę, której podpis w tekście jest inny: „Zdjęcie szczepu *B. thuringensis* IS5056 z transmisyjnego mikroskopu elektronowego” i przedstawia obraz zgodny z podpisem w tekście. Trochę rozczarowany, przystąpiłem do dalszej lektury.

Wstęp

Ta część rozprawy zwyczajowo wprowadza czytelnika w zagadnienia, które będą istotne w jej dalszym toku. Tak jest i w tym wypadku. Wstęp jest napisany jasno; autorka kolejno omawia w nim różne zagadnienia związane z właściwościami *B. thuringensis*. Podczas lektury tego rozdziału od czasu do czasu można wyłapać drobne potknięcia językowe jak np. „wielkość około 600 aminokwasów” zamiast „600 reszt aminokwasowych”, jak też drobne literówki. Chwili zastanowienia się wymaga zdanie „Z mechanizmu działania toksyn wynika ich specyficzność względem gatunków i ich wrażliwość na różnych stadiach rozwoju owada” (str.13). Co ma tu być wrażliwe dla kogo? Toksyna na owada czy też owad na toksynę? Interesujące stwierdzenie znajduje się na str. 16 „Po hydrolytycznej aktywacji (cięciu) toksyny te dwa fragmenty pozostają złączone.” Poprosiłbym o wyjaśnienie, co ulega cięciu a co pozostaje połączone mimo cięcia. Również na kolejnej stronie znajduje się nie do końca zrozumiała informacja „Przenikając do komórek owada Thu staje się analogiem ATP wiązany przez polimerazę RNA, co zaburza pracę RNAzy”. Jaki enzym jest blokowany przez czynnik Thu polimeraza RNA czy komórkowe enzymy degradujące RNA – RNAzy?

Materiały i metody

W tym bardzo istotnym rozdziale mgr Murawska opisuje swoje narzędzia badawcze. Ta część tekstu jest napisana przejrzyście, a oznaczenie różnych odczynników kodami A, B i M jest ciekawym pomysłem. Stosowane odczynniki i metody są opisane z wystarczającą szczegółowością. Moja uwaga dotyczy tylko warunków wirowania. Podanie prędkości obrotowej oraz czasu trwania wirowania jest niewystarczające. Biorąc pod uwagę mnogość sprzętu oferowanego przez różnych producentów należałoby dodać jeszcze typ wirówki oraz rotora lub parametry wirowania podać jako przyspieszenie odśrodkowe „g”, co z resztą ma miejsce w jednym jedynym przypadku przy metodzie 3.3.1. Chciałbym również zaznaczyć, że DNA się nie namnaża a powiela. Słowo namnażanie jest raczej zarezerwowane dla organizmów żywych. Jako malutką złośliwość zapytam co autorka miała na myśli pisząc „Osady DNA... ..zawieszano w 1ml 100mM roztwoiu Tris w ddH₂O.”

MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII UG i GUMed

ul. Antoniego Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

tel. +48 58 523 63 20, fax. +48 58 523 64 30, e-mail: dziekanat@biotech.ug.edu.pl





UNIwersytet Gdański



Wyniki

Ten rozdział zwykle stanowi „intelektualną ucztę” ponieważ zwykle zawiera nowe, często nie opublikowane informacje. Tak było i tym razem, a muszę przyznać, że była to uczta bardzo obfita. W pierwszej części tego rozdziału mgr Murawska opisuje złożoność materiału genetycznego *B. thuringensis* IS5056, który obok chromosomu zawiera aż (!) 14 plazmidów. Następnie autorka przechodzi do szczegółowej charakterystyki genów znajdujących się głównie na poszczególnych plazmidach badanego szczepu. Każda sekcja tego rozdziału przekazuje dużą porcję informacji, głównie o podobieństwie do opisanych homologów. Mimo staranności opisu kilka nieścisłości zakradło się i do tego rozdziału. W końcowej sekcji 3.1. autorka pisze o 3 genach dla których nie udało się określić funkcji, jednak w nawiasie znajdującym się w tym zdaniu wymienia 4 sekwencje kodujące. Podobna sytuacja ma miejsce w rozdziale 3.3 gdzie jest mowa o 11 białkach enzymatycznych a wymienia się ich tylko 10. Na błąd tego typu natykamy się również w sekcji 3.4.1, gdzie jest mowa o 13 kopiach genu kodującego amidazę, ale lokalizacja jest podana tylko dla 12 kopii. Innym rodzajem błędu (lub nadmiernego „skrótów myślowego”) jest stosowanie niepoprawnego terminu „geny białek”. Moją szczególną uwagę wzbudziła część wyników dotycząca ekspresji genów kodujących białka o właściwościach owadobójczych w ich szczepie macierzystym (IS5056) oraz szczepach referencyjnych. Ta część wyników dzieli się na dwie części odpowiadające etapom wyrażania informacji genetycznej: analizie poziomu mRNA oraz ilości syntetyzowanego białka. O ile analiza ilości mRNA przeprowadzona za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym jest perfekcyjna, to analiza ilości produkowanych białek wydaje się być straszliwie nieprecyzyjna ponieważ oznaczano całkowitą ilość białka. Tutaj chciałbym zadać kilka pytań, które być może przybliżą mi tę kwestię: czy istnieją dane mówiące, jaki udział w ogólnej ilości białek mają δ -toksyny? Czy są opisane metody pozwalające w łatwy sposób wydzielić δ -toksyny z lizatu białkowego? Czy nie byłoby precyzyjniej zbadać poziom syntezy poszczególnych toksyn przy użyciu metod opartych na specyficznych przeciwciałach lub możliwym do oznaczenia ilościowo białku reporterowym? Będę wdzięczny za kilka słów odpowiedzi podczas obrony.

Sekcja „wyniki” w pracy Pani mgr Murawskiej ma również, niecodzienny jak dla mnie, układ. Otóż, wszystkie ryciny i tabele do jakich znajdujemy odwołania w tym rozdziale są zgrupowane razem na końcowych stronach ww. rozdziału. Powoduje to konieczność np. przerzucenia ok. 15 stron aby dotrzeć do odpowiedniej ryciny lub tabeli. Uważam, że taki sposób ich umieszczenia nieco utrudnia przyswojenie informacji zawartych w tym rozdziale.

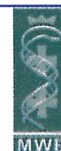
Dyskusja

Ostatni „duży” rozdział pracy przedstawia konfrontację opisanych wcześniej wyników z dostępną wiedzą o bakterii z gatunku *Bacillus thuringiensis*. Ta część pracy jest dość długa, ale jeśli weźmie się pod uwagę ilość danych zaprezentowanych w „Wynikach” staje się to zrozumiałe. Mgr Murawska umiejętnie konfrontuje swoje wyniki z dostępnymi informacjami literaturowymi oraz zawartymi w dostępnych bazach danych, wskazując na podobieństwa i różnice między elementami genomu *B. thuringiensis* IS5056 a innymi szczepami tego gatunku. Prowadzi również rozważania dotyczące powodów rozproszenia informacji genetycznej bakterii tego gatunku na wiele autonomicznych

MIĘDZYUCZELNIANY WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII UG i GUMed

ul. Antoniego Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

tel. +48 58 523 63 20, fax. +48 58 523 64 30, e-mail: dziekanat@biotech.ug.edu.pl





UNIwersytet GDAŃSKI



replikonów. Interesująco przedstawia rolę kontaktu z owadami, które w znaczący sposób wpływają na poziomy transfer DNA umożliwiającą zmianę właściwości poszczególnych szczepów.

Część opisowa pracy zakończona jest sformułowaniem pięciu oryginalnych i nowatorskich z naukowego punktu widzenia wniosków wypływających z przedstawionych informacji dotyczących analizy szczepu *B. thuringensis* IS5056.

W związku z powyższym mogę z całą pewnością stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska spełnia wymogi pracy doktorskiej określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2013 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (Dz.U. 2016, poz. 882 t.j.). Dlatego też wnoszę o do Rady Instytut Biologii Uniwersytetu w Białymstoku dopuszczenie Pani magister Emilii Murawskiej do dalszych części przewodu doktorskiego.

M. Obarłki