

Łódź, 28.04.2017 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Zakład Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Emilii Murawskiej**

Tytuł rozprawy: **“Struktura genomu i entomopatogenność szczepu *Bacillus thuringiensis* IS5056”**

Rozprawa doktorska mgr E. Murawskiej została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii w Instytucie Biologii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku, pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Izabeli Święcickiej. Obiekt badań mgr E. Murawskiej należy do Gram-dodatnich laseczek *Bacillus cereus sensu lato*, występujących w środowisku naturalnym, skąd są przenoszone m.in. do przewodów pokarmowych zwierząt i człowieka. Są to bakterie bardzo ważne z gospodarczego i medycznego punktu widzenia. Jako przykład tego znaczenia można wskazać należące do tej grupy bakterie *Bacillus anthracis*, czynnik etiologiczny węgla oraz *Bacillus thuringiensis*, wykorzystywane w zwalczaniu szkodników roślin uprawnych, a także w sadach, czy lasach. Bakterie *B. thuringiensis* wytwarzają toksyczne dla larw owadów białka zwane δ -endotoksynami lub inaczej białkami Cry. Są one kodowane plazmidowo i często tworzą wewnątrz komórek bakterii struktury krystaliczne, przypominające charakterystyczne układy przestrzenne prostopadłościenne, kuliste lub piramidalne. Poszczególne rodzaje białek Cry wykazują działanie toksyczne względem określonych rzędów owadów. Obok biologicznie czynnych białek Cry *B. thuringiensis* wytwarza też inne białka o właściwościach

owadobójczych, w tym białka Vip (vegetative insecticidal proteins) i białka Sip (secreted insecticidal proteins) oraz niebiałkowe produkty toksyczne np. turingenzynę (Thu) o strukturze oligosacharydu. Wysoce swoiste działanie wobec owadów białek Cry, zostało wykorzystane do wytwarzania insektycydów, zwanych też bioinsektycydami *B. thuringiensis* lub preparatami Bt, stosowanymi na polach uprawnych oraz obszarach o cennych walorach przyrodniczych.

Do wytwarzania bioinsektycydów wykorzystywane są określone podgatunki *B. thuringiensis morrisoni*, *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis*. Postęp w rozwoju technik inżynierii genetycznej doprowadził do uzyskania roślin ze zmodyfikowanym DNA, opornych na szkodniki tzw. roślin Bt. Roślinom takim wprowadzono geny kodujące białka Cry i Vip *B. thuringiensis*. Jednakże z czasem stosowanie bioinsektycydów lub roślin Bt doprowadziło do pojawienia się oporności wśród szkodników. Taka sytuacja wymusza poszukiwanie nowych rodzajów δ -endotoksyn, o silnych właściwościach biologicznych możliwych do wykorzystania w preparatach bioinsektycydów nowych generacji.

Mgr E. Murawska podjęła badania szczepu *B. thuringiensis* IS5056 wyizolowanego z gleby pobranej w Biebrzańskim Parku Narodowym. Szczep ten wyróżniał się, w porównaniu do innych izolatów z północo-wschodniej Polski, syntezą dużych sześciennych kryształów Cry oraz wysoką aktywnością toksyczną wobec larw szkodnika roślin kapustnych błyszczki ni (*Trichoplusia ni*), na poziomie toksyczności szczepów, wykorzystywanych do produkcji komercyjnych owadobójczych preparatów Bt. Badania tego szczepu podjęła Promotor doktoratu mgr E. Murawskiej prof. I Święcicka, charakteryzując jego białka i porównując z kryształami białek szczepów referencyjnych *B. thuringiensis* HD1 stosowanych w produkcji preparatów owadobójczych. Podjęto także badania genetyczne tego szczepu oraz działania owadobójczego białka Cry1Ab21, wykazując zdolność *B. thuringiensis* IS5056

do szybkiej kolonizacji przewodu pokarmowego larw i jego silne działanie biologiczne.

Badania podjęte przez doktorantkę, których celem było wyjaśnienie genetycznych podstaw wysokiej toksyczności szczepu *B. thuringiensis* IS5056 są więc kontynuacją wcześniejszych prac Promotora. Są one ważne, biorąc pod uwagę przedstawione wyżej przez mnie znaczenie tych bakterii, a także możliwość wykorzystania praktycznego badanego szczepu IS5056.

Rozprawa mgr E. Murawskiej ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W obszernym *Wstępie* Autorka przedstawiła na początku problematykę klasyfikacji bakterii w obrębie *Bacillus cereus sensu lato*. W kolejnym rozdziale opisała właściwości owadobójcze *B. thuringiensis*, przedstawiając charakterystykę białek Cry, w tym ich mechanizm działania oraz inne białkowe i niebiałkowe produkty tych bakterii o działaniu bójczym wobec owadów. Przedstawiła też znaczenia tych bakterii w rolnictwie i przemyśle do produkcji bioinsektycydów. Dokonała także podsumowania dotychczasowych wyników badań szczepu *B. thuringiensis* IS5056. Dane przedstawione we *Wstępie* rozprawy, jak i ich analiza świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań eksperymentalnych. Wykazała się dobrą znajomością literatury, omówiła najważniejsze kwestie wiążące się z zdaniami badawczymi przewidzianymi do realizacji w doktoracie. Przedstawiła je w przejrzysty sposób, ilustrując bardzo dobrze przygotowanymi rycinami.

W kolejnym rozdziale Doktorantka sformułowała cel badań tj. ustalenie obecności w szczepie *B. thuringiensis* IS5056 struktur genetycznych i otoczenia genów warunkujących jego silne bójcze właściwości oraz zlokalizowanie ich usytuowania w genomie bakterii. Celem badań szczegółowych było poznanie sekwencji plazmidów niosących geny toksyn owadobójczych oraz porównanie ich do DNA innych, dostępnych w bazach danych plazmidów *B. thuringiensis*. Założono także zsekwencjonowanie całego genomu szczepu IS5056. Kolejny

cel pracy to zbadanie ekspresji białek owadobójczych tych bakterii w porównaniu do szczepów referencyjnych. W mojej ocenie opis celów pracy nie został przedstawiony jasno. Lepiej byłoby przedstawić cel ogólny i następnie w punktach cele cząstkowe, których realizacji Doktorantka się podjęła.

W badaniach mgr E. Murawska zastosowała nowoczesne techniki badań genetycznych i molekularnych adekwatne do postawionych zadań badawczych, w tym m.in. elektroforetyczne, metodę PCR i sekwencjonowania genomu oraz analizy wyników tego sekwencjonowania oraz kodowania genów toksyn Cry i Vip. Materiały i metody potrzebne do realizacji pracy doktorskiej, zostały szczegółowo opisano w oddzielnym rozdziale rozprawy. Rozdział ten wskazuje na dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki do podjęcia badań doświadczalnych, znajomość właściwych do realizacji pracy metod badawczych i umiejętność ich wykorzystania. Zwracam uwagę, iż zastosowano bardzo szeroką gamę różnorodnych technik badawczych. Ich opanowanie wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania i pracowitości, czym się wykazała.

Rezultaty badań mgr E. Murawska starannie opracowała i zaprezentowała w rozdziale *Wyniki*. Podkreślam bogatą ich dokumentację, w formie rycin i tabel. Otrzymane dane Doktorantka zaprezentowała i omówiła w poszczególnych podrozdziałach. Mgr E. Murawska porównała genom szczepu *B. thuringiensis* IS5056 z 36 szczepami referencyjnymi na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych NotI rozdzielonych w metodzie PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) oraz 7 genów metabolizmu podstawowego (MLST – multi locus sequence typing). Biorąc pod uwagę wyniki analizy PFGE wykazała podobieństwo badanego szczepu IS5056 do szczepów *B. thuringiensis* HD8 i HD201, a wyniki badań za pomocą MLST do szczepów HD1 HD2 i T44 001. Doktorantka stwierdziła, iż szczep *B. thuringiensis* IS5056 charakteryzuje się jednym z największych genomów (6,8 mln. pz.) wśród szczepów tego gatunku, co wynika z obecności największej liczbie plazmidów (14 o wielkości ~ 6,9-328,1 tys. pz.). Wykazała, że plazmidy te noszą 6 genów δ -endotoksyn oraz 4

geny białek owadobójczych, syntetyzowanych niezależnie od sporulacji, a także geny kodujące inne białka ułatwiające kolonizację owadów. Plazmidy te charakteryzują się występowaniem wielu sekwencji ruchomych w pobliżu genów δ -endotoksyn. Plazmid pIS56-63, na którym jest umiejscowiony gen kodujący toksynę Cry 1Ab21 *B. thuringiensis* IS50-56 zawiera 4 funkcjonalne moduły: patogenności, koniugacji, regulacji i replikacji. Doktorantka zidentyfikowała też inne geny kodujące białka toksyn leżące na kolejnych plazmidach. Wykazała bardzo wysoką ekspresję genów toksyn owadobójczych na poziomie mRNA i wytwarzania białek. Doktorantka sugeruje, iż silne właściwości owadobójcze *B. thuringiensis* są związane z obecnością wielu plazmidów i genów kodujących białka toksyn umiejscowionych na tych plazmidach oraz możliwości synergistycznego ich działania.

Wyniki badań szczegółowo omówiono w rozdziale *Dyskusja*. Jest to bardzo dobrze opracowana część rozprawy doktorskiej. Wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i jej umiejętności analizy dużej liczby danych. Mgr E. Murawska szczegółowo analizuje uzyskane wyniki w poszczególnych etapach badań, konfrontuje je też z danymi literaturowymi. Przedstawione wnioski wynikają z uzyskanych danych. Doktorantka zrealizowała postawione cele pracy doktorskiej, a uzyskane przez nią wyniki, co warto podkreślić, rozszerzają znacząco naszą wiedzę o strukturach genetycznych bakterii *B. thuringiensis*. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do zastosowanej metodyki badań oraz do uzyskanych wyników i ich interpretacji. Moja uwaga dotyczy strony edycyjnej rozprawy, bowiem znalazłem w niej sporo błędów literowych. Takie błędy i potknięcia stylistyczne zaznaczyłem w egzemplarzu pracy przesłanym mi do oceny. Pragnę też podkreślić, iż nie obniżają one wartości merytorycznej pracy, ale powinny być usunięte przy ostatecznej redakcji tekstu.

Zestawienie piśmiennictwa w liczbie 102 dobrze dobranych pozycji obejmuje szeroki przegląd wiedzy związanej tematycznie z poruszonymi w pracy zagadnieniami, które zostały zacytowane właściwie.

Podsumowując należy stwierdzić, iż mgr E. Murawska uzyskała ważne, znaczące wyniki, potwierdzające wcześniejsze dane o silnych właściwościach owadobójczych szczepu *B. thuringiensis* IS5056, wyjaśniające podstawy genetyczne i molekularne tych cech i wskazujące na możliwość praktycznego wykorzystania tych bakterii lub ich produktów w preparatach bioinsektycydów. W tym kontekście chciałbym zapytać Doktorantkę, co jej zdaniem należy zrobić aby ten cel stał się możliwy do osiągnięcia. Czy podjęto już kroki zmierzające do komercjalizacji uzyskanych wyników badań, tych wcześniejszych i otrzymanych w wyniku realizacji doktoratu, ewentualnie co trzeba zrobić, aby te osiągnięcia wdrożyć ?

Wyniki badań uzyskane w ramach doktoratu mgr E. Murawska opublikowała częściowo ze współautorami w dwóch pracach wydanych w *Genome Announcements* i *Polish Journal Microbiology*. Jest pierwszą autorką obu publikacji. Nie podano źródeł finansowania badań przeprowadzonych w doktoracie.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Emilii Murawskiej pt. "Struktura genomu i entomopatogenność szczepu *Bacillus thuringiensis* IS5056" spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A. Nojahl