

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Ul. F. Joliot Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 5.06.2019

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Stach pt. „**Charakterystyka biochemiczna i strukturalna wybranych proteinaz *Staphylococcus aureus***” wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Promotorem rozprawy jest dr hab. Grzegorz Dubin

Staphylococcus aureus jest groźnym patogenem, powodującym zagrażające życiu infekcje. Jest on odpowiedzialny za szereg chorób od niegroźnych infekcji skóry czy zatruc pokarmowych po zagrażające zdrowiu infekcje powodujące zapalenie szpiku, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych czy sepsę. Nadmierne stosowanie antybiotyków spowodowało alarmujący wyrost oporności bakterii na nie. Alarmujące jest wykrycie szczepów *Staphylococcus aureus* odpornych na tak silne antybiotyki jak metycylina czy wankomycyna. Powstała sytuacja wymaga intensywnych badań fizjologii i patogenyzy tej bakterii ze szczególnym uwzględnieniem czynników wirulencji wśród których istotną rolę odgrywają proteazy sekrecyjne. Jedną z proponowanych strategii zakłada skierowanie terapii na te proteazy. Gronkowiec złocisty wydziela kilkanaście proteaz, wśród których ważną rolę odgrywają proteazy serynowe kodowane przez operon *spl*. Jest to grupa sześciu enzymów, cztery z nich są już scharakteryzowane, pozostałe dwie SplE i SplF są przedmiotem badań opisanych w przedstawionej pracy doktorskiej.

Nasuwa mi się następujące pytania. Jak wpływa na bakterie posiadanie tylko jednego enzymu w operonie *spl* jaki to enzym, czy zawsze ten sam?

W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej p. mgr Natalii Stach jest niezwykle ważny, naukowo aktualny i spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej.

Praca doktorska posiada klasyczny układ, liczy 122 strony maszynopisu i zawiera 22 rysunki i 4 tabel. Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje 134 pozycje. Na początku pracy znajduje się streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wykaz skrótów i spis treści. Kolejno w „Wstępie” liczącym 33 stron maszynopisu doktorantka opisuje klasyfikację proteaz, mechanizmy katalizy wybranych proteaz, specyficzność substratową i metody jej oznaczania. Interesujący jest akapit opisujący rolę proteaz w wirulencji bakterii. Ważny w tej pracy jest dział poświęcony *Staphylococcus aureus*, opisuje jego patogenność, czynniki wirulencji i proteazy zewnątrz komórkowe.

„Cel pracy” – zawarto w krótkim akapicie na stronie 46, a następnie jest opis osiągnięć przedstawiony w ośmiu punktach, chyba niepotrzebnie.

Rozdział „Materiały i metody” przedstawiony nietypowo, bo po „Wynikach”, na dalszych 20 stronach zawiera szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiając wiernie powtórzenie eksperymentów i świadczy o doskonałej znajomości stosowanych metod. Zawiera on również spis stosowanych odczynników. Doktorantka wykazała się szerokim warszatem badawczym, opanowała metody biologii molekularnej, konstrukcji wektorów ekspresyjnych ich zastosowania w nadekspresji białek (SplF, SplE, SplB i ich mutein) w *Escherichia coli*, oczyszczania tych białek oraz standardowe metody oznaczania stężenia białek. Oznacza specyficzność substratową badanych proteaz używając biblioteki substratów fluorogennych oraz kombinatorycznych bibliotek syntetycznych substratów tetrapeptydowych, określa miejsce hydrolizy za pomocą metody spektrometrii mas. Opanowuje metodę krystalizacji białek.

Rozdział „Wyniki” to kolejne 23 strony maszynopisu, został on podzielony na części odpowiadające poszczególnym etapom pracy. Ułatwia to zrozumienie wielowątkowej rozprawy doktorskiej oraz zapewnia przejrzysty układ prezentowanych wyników. Jest on ilustrowany 12 rysunkami i 3 tabelami ułatwiającymi czytelnikowi śledzenie kolejnych etapów pracy.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie, zdaniem recenzenta na podkreślenie zasługuje:

- Charakterystyka biochemiczna i strukturalna ostatniej z sześciu proteaz operonu *spl* *Staphylococcus aureus*
- Ekspresja i oczyszczenie proteazy SplF oraz analiza jej specyficzności substratowej w pozycji P1

- Krystalizacja muteiny proteazy SplF (His39Ala) oraz określenie struktury krystalograficznej z znaczną rozdzielczością (1,9Å)
- Wyznaczenie determinant specyficzności substratowej proteaz SplB i SplE
- Dużym sukcesem jest zmiana specyficzności substratowej SplE na SplB poprzez wprowadzenie tylko dwóch punktowych mutacji. Odwrotna zmiana nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, zaobserwowano jedynie znaczny spadek aktywności muteiny.

Rysunki bardzo dobrej jakości i właściwie opisane ułatwią zrozumienie treści zawartej w wstępie jak i opisanych eksperymentów w rozdziale wyniki. Jedyna moja uwaga dotyczy rysunku 11, gdzie analizując specyficzność substratową konsekwentnie pozycje powinno się oznaczać P1, P2 a nie X1, X2 itd.

Kolejny rozdział to licząca czternaście strony „Dyskusja”, omawiająca wyniki przeprowadzonych doświadczeń na tle aktualnej literatury naukowej dotyczącej prowadzonych badań.

Podsumowuje to dwie strony, na których doktorantka streszcza bardzo syntetycznie swoją pracę doktorską.

Praca napisano językowo poprawnie, ułatwiając jej czytanie i zrozumienie. Praktycznie brak błędów językowych czy edytorskich. Jedyna moja uwaga dotyczy strony tytułowej. W języku polskim zawsze w tym miejscu piszemy najpierw imię, a potem nazwisko. Powinno być: Natalia Stach

Związku z publikacją w Structure 26(4) proszę doktorantkę o podanie procentowo jej udziału w tej publikacji oraz wskazanie w skazanie eksperymentów, które wykonała osobiście.

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej są bardzo wartościowe, nowatorskie, zastosowano w nich szerokie spektrum nowoczesnych technik doświadczalnych, wyniki są zinterpretowane w oparciu o gruntowną znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie proteaz kodowanych przez operon *spl Staphylococcus aureus*.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracą doktorską przewidziane ustawą określonym w art. 13 ustawy z dnia 14. 03. 2003 roku i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr inż. Natalii Stach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na znaczenie naukowe recenzowanej pracy, potwierdzone publikacją w prestiżowym czasopiśmie naukowym, jak również bardzo dobrej i ważnej naukowo nie opublikowanej części doktoratu wnioskuje o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak

Andrzej Szczepaniak