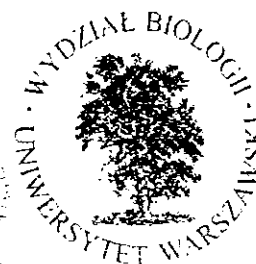




**UNIWERSYTET WARSZAWSKI  
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA  
TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



Prof. dr hab. Jacek Bielecki  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Instytut Mikrobiologii UW

Warszawa, 13. 04. 2015.

**Ocena pracy doktorskiej mgr. Michała Bukowskiego „Charakterystyka hipotetycznego operonu saoABC potencjalnie kodującego nieznaną system regulacji transkrypcji genów u *Staphylococcus aureus*”**

Praca doktorska Pani mgr. Michała Bukowskiego została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Adama Dubina i dr. Benedykta Władyki jako promotora pomocniczego. Realizowane w Zakładzie badania nad identyfikacją i poznanie mechanizmów działania czynników patogenezu u gronkowca złocistego, a także prace nad mechanizmami regulacji ekspresji genów w ramach systemu toksyna – antytoksyna zaowocowały bardzo ciekawym nurtem badań realizowanych przez mgr. Bukowskiego związanych z systemem regulacji transkrypcji genów u *Staphylococcus aureus*. W kolejnych publikacjach wynikających z realizacji projektów badawczych doktorant sygnalizuje istnienie systemu pemIK<sub>sa</sub> i jego oddziaływanie z hipotetycznym genem białka wiążącego DNA. Gen ten, nazwany saoC stał się celem analizy molekularnej i charakterystyki biologicznej w tej bardzo ciekawej rozprawie doktorskiej. Postawienie całej serii szczegółowych celów i konsekwentna realizacja założeń badawczych doprowadziła do opisanego operonu saoABC, mającego wpływ na regulację ekspresji genów czynników patogenezu wyzwalanych w określonych warunkach środowiskowych. Sekwencja prowadzonych badań w celu realizacji założeń rozprawy jest wzorowa. Założenie istnienia hipotetycznego operonu i wytyczenie drogi prowadzącej do jego opisanego to wzór do naśladowania w badaniach molekularnych. Charakterystykę hipotetycznego operonu rozpoczynało określenie bezpośredniego wpływu systemu toksyna-antytoksyna na transkrypcję genu saoC odpowiedzialnego za produkcję jednego z białek wiążących DNA. Białko SaoC zostało przez doktoranta oczyszczone, a jego zdolności do wiązania DNA zostały potwierdzone *in vitro*. Przy okazji opisano właściwości ochronne SaoC względem DNAzyli i oznaczonego, krótkiego odcinka DNA. Fuzja SaoC z białkiem GFP pozwoliła na określenie peryferyjnej lokalizacji tego białka, co wskazywało na regulatorowy charakter hipotetycznego genu saoC wchodzącego w skład operonu saoABC.

Szczegółowa analiza ekspresji genów operonu *saoABC* dały niezwykle ciekawe, ale bardzo trudne do interpretacji wyniki. Wyniki z badań nad ekspresją genów operonu *sacABC* nie były jednoznaczne. Zaobserwowano wzrost ekspresji genów *sacA* i *B* szczepu gronkowca wzrastającego w niskim pH. Natomiast wzrost bakterii w innych warunkach stresowych, takich jak szok osmotyczny czy cieplny, a także wzrost w obecności antybiotyków nie dawał efektu indukcji ekspresji któregokolwiek z genów operonu *sacABC*. Istnieje niewielkie prawdopodobieństwo, aby hipotetyczny operon *sacABC* był zaangażowany tylko i wyłącznie w mechanizmy odporności na niskie wartości pH. Warto zapytać w tym miejscu, jak reagował badany szczep na zasadowe wartości pH. Istnieje duże prawdopodobieństwo współpracy operonu *sacABC* z innymi układami regulacyjnymi komórki, a wykazanie tych zależności wymaga dalszych skomplikowanych badań zarówno pod względem metodycznym. Można też zadać pytanie, w jakim stanie metabolicznym znajduje się komórka podczas wzrostu w niskim pH? Czy na stan komórki bakteryjnej ma tu wpływ wartość pH, a może istnieje ścisły związek ze stadiem VBNC (viable but nonculturable) bakterii? Warto byłoby też przeprowadzić analizę porównawczą właściwości operonu *sacABC* ze znanymi układami regulacyjnymi opisanymi dla innych bakterii. Zadawanych pytań może być znacznie więcej, a odpowiedź na nie mogła by być tematem kolejnych rozpraw doktorskich. Ale ta z pozoru mało istotna obserwacja na temat ekspresji genów operonu *sacABC* w niskim pH stała się podstawą dla rozwoju całego cyklu badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej i stanowi bardzo interesujące studium na temat współdziałania elementów regulacyjnych komórki bakteryjnej związanych ze zmianą warunków środowiskowych. W świetle przedstawionych wyników uprawniony jest wniosek doktoranta, że związek operonu *saoABC* z mechanizmem regulacji transkrypcji zapewnianym przez podjednostkę  $\sigma^B$  oraz zmienność jego genów w niskim pH sugeruje udział systemu w procesach patogenezy. Wniosek ten jest szczególnie istotny, albowiem wiele publikacji w ostatnim czasie wskazuje na rolę podjednostki  $\sigma^B$  na przebieg procesów patogenezy uwarunkowanych przez bakterie. Wykazane w pracy powiązanie między operonem *saoABC* a układem toksyna-antytokasyna także wskazuje na powiązanie hipotetycznego operonu z procesami regulacyjnymi zachodzącymi podczas patogenezy bakteryjnej. Jest też oczywiste, że wyniki te mają również wymiar aplikacyjny, aczkolwiek ta strona znajomości mechanizmów regulacyjnych nie została w rozprawie mocno zaakcentowana.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, t.j. w skład jej wchodzi kolejno: streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja i spis cytowanej literatury. Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona obszernym wstępem.

który został opracowany na podstawie bogatego piśmiennictwa. Bardzo obszerne w pracy są też części: metodyczna oraz wynikowa, co wynika między innymi z faktu, iż dla rozwiązania problemów z konieczności zastosowano szereg wypróbowanych i znanych metod biologii molekularnej. Dane eksperymentalne udokumentowane są za pomocą 18 rycin. Otrzymane wyniki wnikliwie omówiono w dyskusji. Spis literatury jest obszerny, obejmuje ponad 200 pozycji. Oceniata rozprawa doktorska nie zawiera błędów merytorycznych. Tekst nie zawiera błędów językowych, a także, co często zdarza się w rozprawach doktorskich błędów interpunkcyjnych.

Cześć wyników doktoranta poprzedzających pracę doktorską, niejako wprowadzających do rozprawy weszło w skład prac oryginalnych opublikowanych wcześniej w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, takich jak FEMS Microbiology Letters oraz Nature Communications. Wyniki pracy badawczej doktoranta znalazły także miejsce w publikacji w Biochimie, kolejnym czasopiśmie listy filadelfijskiej. Doktorant jest także współautorem 2 prac przeglądowych oraz 2 zgłoszeń patentowych. Doktorant był także współautorem 17 doniesień konferencyjnych oraz kierownikiem dwóch projektów badawczych finansowanych przez NCN. Doktorant brał udział jako wykonawca w kolejnych trzech projektach badawczych finansowanych przez MNiSW. Należy podkreślić w tym miejscu, że wyniki badań prowadzonych przez Pana mgr Bukowskiego znalazły wielkie uznanie i były nagradzane szeregiem wyróżnień, takich jak nagroda indywidualna Amerykańskiego Stowarzyszenia Mikrobiologicznego, nagroda PTB im. Jakuba Parnasa, nagroda Polskiego Towarzystwa Nauk im. Prof. Bassalika. Doktorant był także stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki w ramach programu Start. Szczególnie ważna w tym zestawie osiągnięć doktoranta jest nagroda PTB przyznana w 2014 roku za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii lub biologii molekularnej wykonaną całkowicie w pracowni na terenie Polski. W podsumowaniu oceny pracy doktorskiej pragnę zaznaczyć, że rozprawa jest utrzymana w wysokim standardzie badan interdyscyplinarnych. Uzyskane przez doktoranta wyniki są bardzo wartościowe i stanowią podstawę do dalszych badań. Praca jest bardzo dobra pod względem metodycznym.

#### **Wnioski końcowe:**

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny pracy doktorskiej oraz działalności naukowej Pana mgr Michała Bukowskiego, w tym szczególnie dużej wartości naukowej uzyskanych wyników, w tym wyników oryginalnych oraz istotnych wniosków o

charakterze poznawczym stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Michała Bukowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia zarówno tej bardzo ambitnej pracy doktorskiej, jak i utalentowanego Doktoranta, mgr Michała Bukowskiego, stosownym wyróżnieniem JM Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego. Wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej Pana mgr Bukowskiego oraz jego działalność naukowa uzasadniają w pełni ten wniosek.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
  
*prof. dr hab. Jacek Bielecki*