UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii

Kraków, 11.06.2019r.

Dr hab. Paweł Kaszycki, Zakład Biochemii

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Zielińskiej pt. „Identyfikacja i charakterystyka proteazy fibrynolitycznej (MfpA) produkowanej przez bakterie z rodzaju *Microbacterium*"

Podstawa opracowania recenzji

Niniejszą recenzję przygotowałem na podstawie pisma Pana Prof. dr hab. Zbigniewa Madei, Dziekana Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, datowanego 16 kwietnia 2019r i informującego o powołaniu mnie jako recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Zielińskiej uchwałą Rady Wydziału WBBiB UJ na posiedzeniu w dniu 11 grudnia 2018r.

Zasadność podjętej tematyki pracy doktorskiej

Proteazy stanowią ogromną i bardzo zróżnicowaną strukturalnie i funkcjonalnie grupę enzymów, występujących we wszystkich organizmach, warunkując prawidłowy przebieg procesów życiowych. Bogata, gromadzona od ponad 120 lat literatura przedmiotu, obejmująca kilkaset tysięcy artykułów pozwoliła wykazać istnienie wielu białek o aktywnościach rozkładu innych polipeptydów, jak również zdolnych do autoproteolizy, enzymów o różnym stopniu pokrewieństwa i homologii, różnej specyficzności substratowej, stabilności, rozpuszczalności, odmiennych optimach pracy, wydzielanych pozakomórkowo bądź pozostających wewnątrz komórek, gdzie są kierowane do konkretnych przedziałów czy organelli. Szeroki zakres aktywności poszczególnych proteinaz warunkuje, bezpośrednio lub pośrednio, prawidłowy przebieg większości procesów życiowych, od regulacji ekspresji genów, poprzez komunikację i sygnalizację komórkową, różnicowanie, hemostazę, aż po odporność, starzenie i apoptozę. Enzymy proteolityczne, z jednej strony, prowadzą do częściowego lub całkowitego rozkładu białek w reakcjach katabolizmu komórkowego, z drugiej zaś – w przypadku wystąpienia większej specyficzności cięcia proteolitycznego – modulują aktywności innych białek, często decydując o ich losach w komórce lub warunkując kierowanie do poszczególnych organelli i struktur, a także wpływają na interakcje białko-białko.

Mechanizm działania enzymów proteolitycznych jest przedmiotem badań wielu laboratoriów; wciąż poznawane są też nowe proteinazy, identyfikowane i izolowane z płynów ustrojowych, podłoży hodowlanych, komórek prokariotycznych i organizmów wyższych. Znaczenie prowadzonych badań trudno przecenić, gdyż aktywności proteinaz okazują się być kluczowe w kontekście wirulencji patogenów bakteryjnych, ale też niezwykle istotne dla rozwoju medycyny i farmacji – opracowywania nowoczesnych strategii terapeutycznych i leków, komercjalizowania nowych, aktywnych bioproduktów, hodowli zwierząt, uprawy roślin, czy biotechnologii środowiska. Należy tu podkreślić wieloletnie zaangażowanie w badania proteaz oraz wybitne osiągnięcia w tej dziedzinie zespołów naukowych, pracujących na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie. Na Wydziale tym pracę doktorską wykonywała mgr Gabriela Zielińska, prowadząc badania pod kierunkiem promotora, dr hab. Benedykta Władyki z Zakładu Biochemii Analitycznej. Swoje badania Doktorantka zainicjowała dzięki współpracy z dr Jakubem Kwiecińskim z University of Gothenburg w Szwecji, opierając się na wcześniejszych obserwacjach, dotyczących szczególnych właściwości fibrynolitycznych bakterii *Microbacterium* sp. JK6B.

PL 31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 54
tel. +48 (12) 662 51 87, e-mail: ibrib@urk.edu.pl

Ogólna ocena wartości naukowej pracy

Rozprawa Pani mgr Gabrieli Zielińskiej, licząca 167 stron, 40 rysunków (zawierających wykresy, zdjęcia, schematy), 6 tabel i 13 załączonych informacji szczegółowych, przedstawia dokumentację naukową kompletnego, logicznego, spójnego i wielowątkowego (tu: w rozumieniu racjonalnego, interdyscyplinarnego podejścia badawczego) projektu poznawczego.

W swojej pracy, mgr G. Zielińska dokonała identyfikacji nowego, zewnątrzkomórkowego czynnika proteolitycznego *Microbacterium* sp., a następnie prowadziła prace nad poznaniem uwarunkowań genetycznych wytwarzania enzymu, jego charakterystyką biochemiczną, podejmując również próbę wyjaśnienia faktycznego znaczenia biologicznego oraz wstępnie proponując potencjalne wykorzystanie aplikacyjne. Proteazę, nazwaną białkiem MfpA (*Microbacterial fibrinolytic protease A*), wyizolowała z podłoża hodowlanego *Microbacterium*, poddała częściowemu sekwencjonowaniu oraz identyfikacji proteomicznej, po czym przeprowadziła amplifikację i sekwencjonowanie genu kodującego, jego klonowanie, wspierając się w badaniach nowoczesnymi technikami NGS, które pozwoliły na przeprowadzenie sekwencjonowania genomu aktywnego szczepu oraz na szczegółowe analizy struktury interesujących fragmentów genomu.

Białko MfPA zostało stosunkowo wszechstronnie scharakteryzowane – zaklasyfikowano go do metalopeptydaz rodziny M12, stwierdzono proteolityczną aktywację zymogenu poprzez odcięcie propeptydu, wyznaczono preferencje substratowe (degradacja fibrynogenu i fibryny), wstępnie opisano czynniki hamujące enzym oraz określono budowę centrum aktywnego wraz z podaniem mechanizmu katalizy. Doktorantka analizowała ponadto rozpowszechnienie genu *mfpA* w obrębie taksonu *Microbacterium*. Przebadawszy kolekcję 26 szczepów należących do tego rodzaju, stwierdziła znaczną konserwatywność sekwencji genu, a w analizach fenotypowych – zależne od szczepu różnice w aktywności fibrynolitycznej MfpA. W doświadczeniach *in vivo* badała oddziaływanie *Microbacterium* spp. na organizm modelowy *C. elegans* w kontekście wybranych, wysoko- i nisko- aktywnych proteolitycznie szczepów, wykazując negatywny wpływ na przeżywalność i wzrost nicieni. W niezależnym cyklu badawczym wykonała też analizy hamowania wytwarzania biofilmu bakterii *S.aureus* oraz degradacji (dyspersji) już istniejącego biofilmu, opierając się na obserwacjach interakcji między oczyszczoną proteazą MfpA i komórkami *S. aureus*, jak również między hodowanymi bikulturami bakterii *S. aureus* i *Microbacterium* sp.

Poprawność języka

Praca jest, zasadniczo, napisano dobrym stylem i poprawnym językiem rozpraw naukowych. Widoczna jest dbałość Autorki o profesjonalnie używane słownictwo i jakość wypowiedzi. Niemniej, wkradły się miejsca, w których zwyciężyła pokusa bezpośrednich zapożyczeń z języka angielskiego albo wręcz laboratoryjnych zwrotów żargonowych. Zwracam uwagę na wybrane, szczególnie rażące zwroty i wyrażenia, których należy unikać i poprawić w razie opracowania tekstu do publikacji polskojęzycznej:

- czynniki... bakterie ***adherują*** ... (m.in. str. 14, 18, 29, 32
- geny... białka... ***ekspresjonowano*** ... (m.in. str. 39, 52, 65
- cząsteczka substratu jest ***procesowana*** ... (str. 12)
- roztworu ***zadozowanego*** na powierzchnię (str. 65)

nieco drażni również nadużywanie terminu „**odtrawianie**" (w sumie użyte w pracy 15 razy), oraz: „**inhibicja**", „**flankowania**", ale w tych przypadkach ustępuję, gdyż sformułowania te zadomowiły się w pracach polskojęzycznych...

Inne, zauważone w toku czytania drobne błędy pisowni, typograficzne, stylistyczne czy gramatyczne oraz ewidentne pomyłki edytorskie nie mają ważnego znaczenia dla wartości pracy i dlatego, z obowiązku recenzenta, zestawiłem je w postaci spisu przekazanego bezpośrednio Autorce.

W niniejszej części recenzji podaję także inne, mało fortunne sformułowania, wymagające korekty:

- str. 33, 105: użycie terminu „***redukcja*** biofilmu; wykazanie ***redukującego*** wpływu MfpA na biofilm... proteazy ***redukujące*** tworzenie biofilmu... " jest całkowicie wadliwe, sugeruje wręcz przynależność peptydaz do innej grupy enzymów (!). Właściwsze byłoby określenie: „degradacja struktury, dyspersja, rozkład...".

- str. 22, 30: ***„antybiotykoodporność..."*** – bakterie wykazują oporność

- str. 25: „***dekompozycja***" ropy naftowej... piór ptasich... , sugeruje inny proces niż poprawnie użyta „biodegradacja lub biotransformacja składników..."

- str. 138: „*możliwie* pełna charakterystyka" – (?)

- str. 132: „... ***hamowania biofilmu*** gronkowcowego na etapie jego tworzenia..."; lepiej przecież: „hamowanie wytwarzania biofilmu"

- „***inhibicja biofilmu*** następowała.."; lepiej przecież: „Największe zahamowanie powstawania biofilmu występowało..."

Charakterystyka pracy z podziałem na rozdziały

1. Rozdział ***Wstęp*** (23 strony) jest bardzo dobrze napisanym, ilustrowanym dwoma czytelnymi schematami, przeglądem literaturowym. Jest skonstruowany inteligentnie i sprawnie, odnosząc się do kolejnych szczegółowych tematów badawczych pracy doktorskiej: Podrozdział *Proteazy* zawiera dogłębny opis problematyki tych enzymów w kontekście ich znaczenia biologicznego, m.in. zjawiska krzepnięcia krwi, roli fibryny i fibrynogenu, wirulencji enzymów bakteryjnych, w tym szczególnie proteaz fibrynolitycznych.
Wsparta wieloma adekwatnymi odnośnikami bibliograficznym (ponad 40 pozycji), informatywna *Charakterystyka rodzaju Microbacterium* pozostanie dla mnie cennym źródłem wiedzy w prowadzonych badaniach z wykorzystaniem szczepów środowiskowych tego gatunku. Z kolei, część *Biofilmy bakteryjne* koncentruje się głównie na problematyce związanej z kolonizacją przez bakterie patogenne, w ten sposób naświetlając merytorycznie ten etap pracy, w którym badano interakcje MfpA z biofilmami *S. aureus*.

2. ***Cele pracy*** – wyznaczone prawidłowo i podane klarownie, wraz z uzasadnieniem (*Geneza projektu*). Doceniam sposób formułowania celów szczegółowych – jako dynamicznie pojawiających się nowych dążeń badawczych wskutek gromadzonej w trakcie badań wiedzy i pozyskiwania na bieżąco wyników kolejno prowadzonych doświadczeń. Hipotezy badawcze, jakkolwiek nie zawsze zostały one sformułowane w tekście explicite, jednak logicznie wynikają z organizacji całości projektu oraz racjonalizacji eksperymentów.

3. Rozdział ***Materiały*** zawiera prawidłowo dokonane zestawienie wykorzystanego sprzętu i aparatury, kolumn chromatograficznych, odczynników, reagentów „kitów", wektorów, oligonukleotydów, wzorców, wraz z podaniem stosownych źródeł ich pochodzenia. Podobnie jest z wystarczająco szczegółową charakterystyką materiału biologicznego (badane bakterie *Microbacterium* spp., nicienie *C.elegans*, szczepy *E.coli*, *S.aureus*).

4. Metodyka została przez Doktorantkę opisana wzorowo (***Metody***, 26 stron, w tym tabela sekwencji kodujących *mfpA* oraz dwa schematy doświadczeń), zawiera wystarczająco szczegółowe opisy prac laboratoryjnych, pozwalające na ich ewentualne powtórzenie oraz na krytyczną ocenę wyników. Podkreślam tu kompetencje Autorki, która wykazała się bardzo dużą wiedzą teoretyczną i praktycznymi umiejętnościami prowadzenia bardzo zróżnicowanych eksperymentów. Wśród nich znalazły się też stosunkowo nowe ujęcia tematyki badawczej, co warto podkreślić, gdyż stanowią one również autorskie osiągnięcie Doktorantki. Zwracam również uwagę na przemyślane i starannie dobrane szczegółowe warunki doświadczeń (np. zakresy stężeń, rozcieńczeń, liczebności drobnoustrojów, parametryzację i ustalone optima, itp.), jak również właściwie dobrane, niezbędne analizy kontrolne, próby ślepe i referencyjne, dzięki czemu łatwiej jest dokonać oceny uzyskanych, statystycznie znaczących wyników w szerokim ujęciu – znaczenia biologicznego.

Doktorantka w swojej pracy udokumentowała wyniki uzyskane z wykorzystaniem wielu standardowych, jak również zaawansowanych technik analitycznych, takich jak spektrofotometryczne

i turbidymetryczne pomiary aktywności enzymatycznej, elektroforeza DNA w żelu agarozowym, SDS-PAGE wraz z elektrotransferem białek, zymografia, sekwencjonowanie metodą degradacji Edmana (tu zaznacza pomoc dr hab. Pawła Maka), chromatografia cieczowa (jonowymienna i sączenie molekularne), analizy PCR, klonowanie genu i otrzymywanie białka rekombinowanego, a także nowoczesnych analiz genomowych (NGS w firmie Genomed S.A.) i proteomicznych (LC-MS, podkreślając udział dr Oliwii Bocheńskiej z Zakładu Biochemii Analitycznej) zwieńczonych zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych – baz danych, wyszukiwarek sekwencji i algorytmów, stosowanych samodzielnie i profesjonalnie. Przeprowadziła obrazowanie i analizy biofilmów bakteryjnych, a ponadto wykazała się też umiejętnością rutynowego prowadzenia hodowli bakterii oraz nicieni *C. elegans*.

5. Największa część pracy – 42-stronicowe ***Wyniki***, obejmujące 31 znakomicie opracowanych i dobrze opisanych rysunków oraz dwie tabele, zostały zaprezentowane czytelnie i systematycznie, konsekwentnie realizując ogólny konspekt pracy. Uzyskane rezultaty konkretnych doświadczeń poddano rzetelnej i prawidłowej ocenie statystycznej, stosując testy dobrane adekwatnie do specyfiki eksperymentów.

Nie wchodząc tutaj w opis poszczególnych badań (najciekawsze z wyników zostały zestawione w postaci najważniejszych osiągnięć pracy), mam dwa komentarze, z prośbą o ustosunkowanie się Doktorantki do przedstawionych zagadnień.

5.1. Komentarz dotyczący dokumentacji eksperymentalnej wpływu MfpA na tworzenie biofilmu *S.aureus*. Autorka słusznie zwróciła uwagę na szczególny rodzaj biofilmu wytwarzanego *S. aureus*, to znaczy preferencyjnej roli fibrynogenu gospodarza jako czynnika podporowego, sprzyjającego adhezji komórek gronkowcowych, a w konsekwencji, kolonizacji i wytwarzania zewnątrzkomórkowej macierzy biofilmu. W odniesieniu do zakażeń gronkowcem złocistym oraz dodatkowego zagrożenia wytwarzanym biofilmem, działanie MfpA degradujące biofilm mogłoby przynieść znaczne korzyści praktyczne. Doktorantka postawiła hipotezę, że proteolityczny atak na fibrynogen jako podłoże wiążące bakterie, będzie stanowić podstawę dla przyszłego zastosowania MfpA jako czynnika przeciw-biofilmowego i w tym ujęciu byłby to przekonywujący przykład perspektyw aplikacyjnych nowej proteinazy.
Zestawienie wyników eksperymentów jest obszerne i można oczekiwać, że po uzupełnieniu o niezbędne, konkluzywne „dalsze badania", powstanie gotowy materiał doświadczalny do opublikowania. Uważam, że pomimo zasygnalizowanych trudności technicznych, cykl doświadczeń został zaplanowany i przeprowadzony bez zarzutu, uwzględniając wszystkie warianty, których rezultaty pozwalają na wnioskowanie o mechanizmie wpływu żywych kultur *Microbacterium*, jak również wytwarzanego przez te bakterie MfpA, na biofilmy *S. aureus*.

Uzyskane wyniki wymagają jednak głębszej i bardziej krytycznej analizy. (Tu zwracam się do Doktorantki o stosowny komentarz i próbę wyjaśnienia pojawiających się wątpliwości). Mianowicie, wykazany został efekt hamujący proteazy MfpA na tworzenie biofilmu, zwłaszcza wytwarzanego na powierzchniach wcześniej traktowanych fibrynogenem. Jednocześnie, następowała dyspersja już istniejącego biofilmu, co zostało prawidłowo skorelowane z wcześniejszymi obserwacjami specyficznej degradacji fibrynogenu. Niezależnie jednak, cyt. „obecność MfpA w pożywce nie hamuje wzrostu planktonicznego *S. aureus* ... Przeciwnie ..."
Otóż, dyspersja biofilmu *S.aureus* jest jednym z „celowych" mechanizmów propagacji zakażeń wewnątrzustrojowych przez te bakterie, umożliwiając uwolnienie komórek planktonicznych i kolonizację nowych organów i tkanek. Czy zatem nie należy uwzględnić możliwości wywołania skutku przeciwnego, to znaczy ryzyka promowania zakażeń *S. aureus* na skutek częściowego rozpadu struktury biofilmu po traktowaniu MfpA? Czy Doktorantka ma pomysł, jak wyeliminować powyższe zagrożenia?

5.2. Za stosunkowo mniej znaczące naukowo wyniki, i niemające szczególnego wkładu w poszerzanie obecnego stanu wiedzy, uważam wyłącznie jedno z prezentowanych podejść, mianowicie analizy interakcji *Microbacterium – C. elegans*. Badania te oczywiście są interesujące pod względem dobranego modelu

i wykazania stosowalności tego typu testów w analizach wirulencji, czy też, ujmując bardziej ogólnie, oddziaływania drobnoustrojów na faunę o wyższej od Prokaryota organizacji. Należy tu uznać istotność problemu, zwłaszcza wobec słusznie postulowanego podejrzenia Doktorantki, że badany szczep może być potencjalnie patogenny dla człowieka. W przeprowadzonym jednak cyklu prac nie udało się wykazać roli MfpA jako czynnika patogenności *Microbacterium*. Jednocześnie, sam fakt wykazania negatywnego oddziaływania szczepów - przedstawicieli rodzaju bogato reprezentowanego przez patogeny – był w mojej opinii wynikiem raczej oczekiwanym (np. *Microbacterium nematophilum* opisano jako patogen dla *C.elegans*). Jednakże, powyższa uwaga krytyczna nie umniejsza pracy traktowanej całościowo, jako wielowątkowy zestaw badań poznawczych. Na obronę zasadności podjętego przez Doktorantkę wysiłku należy tu podać argument, że nie można było się przewidzieć rezultatu a priori, a ewentualne udowodnienie roli MfpA jako bezpośredniego czynnika wirulencji stałoby się niewątpliwie nowością znaczącą.
W tym miejscu proszę Doktorantkę o zwięzłą wypowiedź (uzupełniając interpretacje już podjęte w rozdziale *Dyskusja*) zawierającą propozycje innych niż MfpA przyczyn (czynników, procesów) mogących mieć znaczenie dla hamowania *C.elegans* przez testowane szczepy *Microbacterium*.

6. Rozbudowana ***Dyskusja***, licząca 26 stron, została podzielona na podrozdziały, co czyni ją przejrzystą i zrozumiałą. Zawiera bardzo wartościowe, twórcze odniesienie do uzyskanych wyników, w tym krytyczną ich analizę oraz kompetentnie podany kontekst literaturowy (np. Tabele 5 i 6). Autorka m.in. zaproponowała schemat działania MfpA (Rys. 36), wskazując przypuszczalne miejsca hydrolizy w obrębie cząsteczki fibrynogenu (Rys. 37) oraz udział MfpA w poszczególnych etapach fibrynolizy (Rys. 39).

7. Zestawienie źródeł (***Literatura***) obejmuje 235 pozycji, stanowiąc bardzo rzetelnie dobrany zbiór. Wszystkie prace należy uznać, zgadzając się z Autorką, za istotne z punktu widzenia przekazu merytorycznego oraz dyskusji wyników; obejmują one zarówno publikacje dawniejsze, jak i artykuły ostatnich lat. Źródła bibliograficzne są zacytowane w tekście pracy w odpowiednich miejscach, aczkolwiek forma cytowań powinna zostać poprawiona (niepotrzebne powtarzanie nawiasów, jak np.: (Marrie & Costerton 1984), (Vanassche et al. 2013)) – powinno być: (Marrie & Costerton 1984; Vanassche et al. 2013). W samym zestawieniu można znaleźć sporadyczne błędy formalne – niespójny sposób przytaczania niektórych czasopism, niewłaściwie podane tytuły, inne drobne niedociągnięcia; jednak jest to w mojej opinii sprawa drugorzędna, gdyż podczas przygotowania do publikacji i tak Autorka będzie musiała sformatować pozycje literatury na nowo, według ustalonych kryteriów.

Inne uwagi i wątpliwości

1. Ważna wątpliwość, niemająca cechy wady merytorycznej, a dotycząca nazwy białka: pozwalam sobie zasygnalizować problem, zwłaszcza, że materiał badawczy jeszcze oczekuje na publikację. Bardzo proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do treści poniżej, i mam nadzieję, że moja uwaga okaże się przydatna dla jednoznaczności ewentualnych przyszłych cytowań osiągnięcia:

cyt. „nowoodkryta proteaza otrzymała nazwę – MfpA (ang. Microbacterial fibrinolytic protease A)

W literaturze dotyczącej produktów białkowych (od 2004r.), jak również w proteomicznych bazach danych (np. UniProt, Card.master.ca) figuruje już, i jest cytowane, białko MfpA, charakterystyczne dla rodzaju *Mycobaterium* (m.in. *M. smegmatis*). Jest to tzw. *Pentapeptide repeat protein MfpA*, interesujące homodimeryczne białko strukturalnie naśladujące B-DNA (DNA-mimicking), utworzone z powtarzalnych sekwencji pentapeptydowych o strukturze beta-helikalnej, wiążące się do girazy DNA, odpowiedzialne za oporność na antybiotyki fluorochinolonowe.

Czy jest zatem możliwość uniknięcia swoistej „kolizji oznaczeń" białka, czy też Autorka, mając świadomość przedstawionych faktów, uznaje problem za mniejszej wagi?

2. Problem terminologiczny, zawierający dość poważny błąd, ale – jak rozumiem – wynikający wyłącznie z niedopatrzenia (proszę o wyjaśnienie).
Na stronach 122, 125, 127, 128, 137 – zamiennie, za aktywności ***fibrynolityczne*** używane jest sformułowanie ***fibrolityczne***.
Jest to błąd, odsyłający do innego źródłosłowu (ang. fiber; bakterie fibrolityczne to drobnoustroje rozkładające złożone polisacharydy roślinne, dzięki aktywnościom enzymów degradujących celulozę i hemicelulozy).
Przewrotnie, zwracam tu jednak uwagę na faktycznie używane terminy: (a) alternatywną nazwą enzymu proteolitycznego, alfimeprazy jest: ***fibrolaza***, opisywana jako „active fibrinolytic agent" ; (b) w terapii mówi się niekiedy o ***leczeniu fibrolitycznym***, polegającym na rozpuszczaniu skrzepliny za pomocą leków.

Pozostałe walory pracy

Bardzo dobra organizacja tekstu (choć z kilkoma uwagami w nawiasach) – praca czytelna, a strona graficzna pracy i estetyka – bez zarzutu. Oprócz rozdziałów „standardowych", typowych dla prac naukowych, Autorka wzbogaciła zawartość o zestawienia, znacznie ułatwiające zrozumienie całości wykonanych badań:
- *Wykaz stosowanych skrótów* (czemu jednak zaledwie 8 pozycji? Szkoda, gdyż w pracy stosowanych jest wiele skrótów, ważnych dla podjętych problemów, a definiowanych niezależnie w tekście),
- *Spis materiałów graficznych* (uwaga: czemu akurat taki tytuł tego zestawienia? – spis uwzględnia przecież również tabele i załączniki),
- *Wykaz zasobów internetowych i programów komputerowych* (wartościowy spis, chociaż korzystnie byłoby podać w postaci krótkiego opisu – kiedy, gdzie i do czego wykorzystano konkretną bazę danych, algorytm czy program zestaw),
- rozdział: *Załączniki*, zawierający m.in. szczegółowe sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe, określenie miejsca cięcia proteolitycznego, wyniki analiz bioinformatycznych, identyfikacyjnych i porównawczych, produkty degradacji fibrynogenu przez MfpA.
- Wysoko również oceniam pomysł na zawarcie w *Dyskusji* – rozdziałów pt. *Dalsze perspektywy badań* oraz *Oryginalność projektu*, a w rozdziale *Cele pracy*: opis *Genezy projektu.*

Ponadto, zwraca uwagę dobrze zaplanowana forma odsyłaczy do wyników, np.: (Rysunek 22, strona 95), ułatwiająca łatwe sięgnięcie do danych źródłowych, szczegółowy spis treści i podział na tematyczne podrozdziały oraz schematy ideowe i protokoły doświadczeń (np. Rys.3., Rys.4), pomocne w zrozumieniu często skomplikowanych, wielowariantowych testów.

Najważniejsze osiągnięcia

Spośród wielu przedstawionych w pracy Doktorantki osiągnięć naukowo-badawczych, za szczególnie interesujące uważam następujące:

1. Identyfikację białkowego czynnika fibrynolizy w medium hodowlanym *Microbacterium* sp. JK6B. Jest to znaczące odkrycie wzbogacające zestaw dotychczas poznanych interesujących proteinaz produkowanych przez rodzaj *Microbacterium.*
2. Izolację białka o aktywności proteolitycznej, nazwanego MfpA (Microbacterial fibrinolytic protease A).
3. Częściowe sekwencjonowanie proteazy MfpA.
4. Ustalenie sekwencji genu *mfpA.*
5. Klonowanie i otrzymanie rekombinowanego białka MfpA.
6. Charakterystyka biochemiczna enzymu, w tym zwłaszcza określenie specyficzności substratowej, optimum działania i charakterystyka miejsca aktywnego.
7. Próba określenia potencjału aplikacyjnego MfpA jako czynnika ograniczającego wytwarzanie biofilmu przez *S. aureus.*
8. Badania dystrybucji genu *mfpA* oraz aktywności fibrynolitycznej w obrębie przedstawicieli (kolekcja 26 szczepów) rodzaju *Microbacterium.*

W podsumowaniu:

stwierdzam, że opisana w pracy doktorskiej mgr G. Zielińskiej identyfikacja czynnika proteolitycznego jako proteinazy fibrynolitycznej MfpA, wytwarzanej przez szczepy *Microbacterium,* a następnie izolacja, klonowanie oraz wszechstronna charakterystyka nowego enzymu, jest oryginalnym i znaczącym osiągnięciem naukowym. Rezultaty badawcze wsparte nowoczesną metodologią i czytelną prezentacją wyników, ukazane w kontekście wartościowego przeglądu literatury oraz krytycznie i twórczo przedyskutowane, decydują o wysokim poziomie złożonej dysertacji. Cele pracy zostały osiągnięte w całości, a hipotezy badawcze zweryfikowane prawidłowo, w toku wielowariantowych doświadczeń.

Mając na uwadze wymienione przeze mnie szczególnie cenne osiągnięcia oraz tempo prowadzonych prac przez laboratoria konkurencyjne uważam, że praca powinna doczekać się jak najszybszego opublikowania – wyniki stanowią bowiem niezwykle cenny wkład naukowy i – według wszelkich przewidywań – mogą mieć ważny kontekst aplikacyjny. W myśl takiego rozumienia stawiam ten problem w poczuciu swoistego niedosytu, licząc, że moja wysoka ocena wartości osiągniętych rezultatów badawczych i pozytywna, ogólna ocena pracy doktorskiej, zmobilizują Doktorantkę do sprawnego przygotowania publikacji.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani **mgr Gabrieli Zielińskiej** spełnia wymagania dla prac doktorskich, zawarte w Ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, prowadzonego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.

