

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

Imię i nazwisko kandydata: Katarzyna Leśniak

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Molekularna charakterystyka i znaczenie cykazy glutaminylowej dla bakterii *Porphyromonas gingivalis*”

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Promotor pomocniczy: dr Danuta Mizgalska

Recenzent: prof. dr hab. Teresa Olczak

1. Tematyka rozprawy

czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-150 słów):

Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób przyzębia, często korelujących ze schorzeniami systemowymi o podłożu zapalnym, ze szczególnym uwzględnieniem jednego z kluczowych czynników etiologicznych tych chorób, czyli bakterii *Porphyromonas gingivalis*. Tematyka ta, realizowana w zespole prof. Jana Potempy od wielu lat, należy do aktualnych zagadnień badawczych mających znaczenie dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne. Założenie pracy doktorskiej to poznanie podstaw procesów wykorzystywanych przez bakterie *P. gingivalis* do przeżycia, zapoczątkowania i rozwoju dysbiozy w mikrobiomie jamy ustnej, skutkującej chorobami przyzębia. Podejmując taki temat pracy doktorskiej, Doktorantka uzupełnia aktualną wiedzę w tej dziedzinie i wskazuje na konieczność dalszych badań w celu opracowania skutecznych metod leczenia chorób przyzębia.

2. Wiedza kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-250 słów):

W rozprawie doktorskiej Doktorantka prezentuje bardzo szeroki, interdyscyplinarny zakres wiedzy teoretycznej. Świadczy o tym bardzo dobrze napisany i wyczerpujący wstęp pracy doktorskiej oraz wykorzystanie w całej rozprawie 265 pozycji literaturowych, dobrze dobranych i prawidłowo cytowanych. Wstęp rozprawy doktorskiej zawiera przedstawienie znaczenia chorób przyzębia oraz współtowarzyszących chorób systemowych w odniesieniu do konieczności poszukiwania dalszych metod ich leczenia. Opisuje także zależności zachodzące pomiędzy bakteriami w mikrobiomie jamy ustnej, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis*. Duża część wstępu to bardzo dobry opis szlaków umożliwiających transport białek bakteryjnych oraz potranslacyjnych modyfikacji białek, co jest bardzo pomocne w zrozumieniu zaplanowanych doświadczeń i uzyskanych z nich wyników. Także w rozdziale Dyskusja Doktorantka zamieściła teoretyczne wyjaśnienia pozwalające na lepsze odniesienie się do własnych wyników i ich korelacji z danymi literaturowymi.

3. Samodzielność kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora (sugerowane ok. 50-250 słów):

Założony cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki pozwoliły na dalszą charakterystykę cykazy glutaminylowej. Do realizacji założonego celu pracy Doktorantka wykorzystwała szeroki panel metod badawczych (m.in. różnorodne techniki biologii molekularnej, analityczne i preparatywne metody biochemiczne, hodowle bakteryjne, analizy spektrometryczne, metody bioinformatyczne). Imponująca jest liczba uzyskanych zmutowanych szczepów, zmodyfikowanych szczepów kontrolnych oraz analiza w nich zmodyfikowanych białek, a nie jest to proste ze względu na ograniczone możliwości mutagenyzy u bakterii *P. gingivalis*. Taka różnorodność zastosowanych metod i technik wskazuje nie tylko na szeroki zakres nabytych umiejętności, ale także na zdolność do (samodzielnego lub we współpracy z promotorami) ich odpowiedniego doboru w zależności od badanego problemu. W oparciu o przedstawiony w rozprawie udział Doktorantki, w tym klarowne przedstawienie udziału w prowadzonych badaniach innych osób stwierdzam, że Pani mgr Katarzyna Leśniak wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia badań, interpretacji uzyskanych wyników oraz ich przedstawienia. Świadczy o tym również współautorstwo, jako pierwszy autor, w publikacji prezentującej wyniki pracy doktorskiej.

4. Oryginalność rozprawy

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej (sugerowane ok. 100-250 słów):

Praca doktorska prezentuje dalszą, bardzo szczegółową charakterystykę cykazy glutaminylowej. Ze względu na szeroki zakres różnorodnych doświadczeń, pozwalających na uzyskanie tak ogromnej liczby wyników, stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pomimo uzyskanych wcześniej i opublikowanych danych na temat białek należących do tej grupy enzymów, zarówno tych dotyczących charakterystyki enzymów z różnych organizmów, jak i ich substratów, wliczając w to potencjalne inhibitory ich aktywności, nadal istotne są poszukiwania specyficznych celów terapeutycznych wykorzystywanych do redukcji lub eliminacji bakterii *P. gingivalis*. Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których część to dane nowe, wnoszące duży wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw mechanizmów umożliwiających przeżycie bakteriom *P. gingivalis*. Uzyskane wyniki potwierdzają niezbędność tego białka do przeżycia bakterii oraz istotny wpływ na wirulencję bakterii. Ze względu na udział w modyfikacji istotnych czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis* (przedstawiona w rozprawie doktorskiej m.in. identyfikacja modyfikowanych przez badany enzym substratów, w tym istotnego dla sekrecji systemu T9SS, a także szczegółowo badanych gingipain), badane białko i jego substraty mogą być celem kolejnych doświadczeń. Z pewnością potrzebne będą dalsze badania, ale uzyskane wyniki stwarzają możliwość ich potencjalnego wykorzystania do opracowania nowych metod leczenia, a w przyszłości poprawy jakości życia pacjentów z chorobami przyzębia.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:

Pomimo właściwego przedstawienia uzyskanych wyników, ich wysokiej wartości naukowej oraz szerokiej dyskusji, prosiłabym o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do

kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu wyjaśnienia i poszerzenia kilku kwestii.

1. Na str. 142 Doktorantka pisze: „ W tym kontekście ciekawą obserwacją było wykrywanie białka QC w wszystkich pożywkach pochodzących z hodowli szczepów z nadekspresją PgQC (QC^{WTp}, QC^{WTm}, QC^p i QC^m; rycina 17). Może być to spowodowane wyciekami nadmiarowej ilości QC do pożywki hodowlanej, co ma na celu zmniejszenie obciążenia komórki nadmiarową liczbą cząsteczek białka.” Co Doktorantka rozumie przez pojęcie „wycieku” ?
2. Inaktywacja genów *PG_2158* i *PG_2159*, w porównaniu ze szczepem dzikim, oprócz różnic w aktywności gingipain, nie wykazała istotnych zmian w badanym fenotypie w warunkach laboratoryjnego wzrostu *in vitro*. Czy przeprowadzono badania w warunkach bardziej zbliżonych do warunków *in vivo* ? Jeśli nie, to jakie doświadczenia może Doktorantka zaproponować.
3. Zasadniczo białka kodowane w jednym operonie biorą udział w szlaku metabolicznym/procesie. Jak wytłumaczyć obecność genów kodujących PgQC, *PG_2158* i *PG_2159* w jednym operonie i brak zaangażowania białek *PG_2158* i *PG_2159* w proces cyklizacji przez PgQC ? Prosiłabym o poszerzenie dyskusji, dlaczego brak białek *PG_2158* i *PG_2159* ma wpływ na ekspresję/aktywność gingipain ?
4. Analizując potencjalne występowanie PgQC w kompleksie z innymi białkami z wykorzystaniem metody przedstawionej w rozprawie doktorskiej, Doktorantka wyklucza taką możliwość. Czy można wykorzystać inne podejście badawcze, aby to potwierdzić ?

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy:

Pod względem merytorycznym praca doktorska jest napisana bardzo dobrze. Pomimo zamieszczenia w niej ogromnej ilości danych, jest ona przejrzysta, zrozumiała i czyta się ją z ciekawością. Bardzo dobrze opracowane są rysunki i tabele oraz tabela w załączniku (jest to Tabela S2; czy powinna być też Tabela S1 ?). Każdy rozdział zakończony jest podsumowaniem, co ułatwia zrozumienie tak wielu wyników.

W pracy pojawiają się nieliczne niedoskonałości, które nie wpływają na wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a część z nich wskazuję tylko z obowiązku recenzenta i nie wymagam odniesienia się do nich. Jest to m.in. zamienne stosowanie „parodontoza” i „paradontoza”, „technika Western blotting” i „technika western blot”.

Część rysunków nie jest zamieszczona we właściwym miejscu w odniesieniu do opisu (str. 18, 99, 101).

Na str. 132 jest „...szczep *PG_0449*^{Q22N,his} z substytucją Gln22Asp...”, a powinno być „...z substytucją Gln22Asn...”

Na str. 141 Doktorantka pisze: „Natomiast, *PG_2159* (HemG) jest oksydazą protoporfirynogenu, której funkcja jest związana z pobieraniem hemu z otoczenia (Olczak i in., 2005).” Wydaje się, że HemG, jako nieliczne białko ze szlaku biosyntezy hemu u *P. gingivalis*, może raczej brać udział w modyfikacji dostępnych w komórce porfiryn. O tym, że nie jest to białko kluczowe w pozyskiwaniu hemu świadczą wyniki uzyskane przez Doktorantkę.

Na str. 145 jest: „...do bezpośredniej modyfikacji N-końcowych reszt Asn białek...”, a powinno chyba być „...Gln...”.

Na str. 148 jest: „...zaplanowano eksperyment mający na celu zmianę umiejscowienia PgQC z błony wewnętrznej na błonę peryplazmatyczną.”, a powinno być „do peryplazmy.”

Do oceny poziomu transkryptu raczej stosuje się skrót RT-qPCR, a nie qPCR (str. 153).

7. Ocena końcowa:

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Pani mgr Katarzyny Leśniak** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o

szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Pani mgr Katarzyny Leśniak** do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

TAK/NIE(*)

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK/NIE(*)

Uzasadnienie wniosku (w przypadku zaznaczenia odpowiedzi TAK):

Uzasadnieniem wniosku o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej jest szeroki zakres prowadzonych badań, znacznie przekraczający zawartość typowych rozpraw doktorskich, uzyskanie nowych, istotnych wyników, w dużej części opublikowanych w renomowanym czasopiśmie (mBio). Dodatkowo, bardzo aktywne zaangażowanie Doktorantki w pracę badawczą, potwierdzone przez pozostały dorobek naukowy, niezwiązany ściśle z tematyką rozprawy doktorskiej, opublikowany w bardzo dobrych czasopismach (PNAS, Mol Oral Microbiol), oceniam również wysoko.

20.01.2025 r.

data sporządzenia recenzji



podpis recenzenta

(*) niepotrzebne – skreślić.