

NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



Warszawa, 20.04.2017

dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL

Zakład Mikrobiologii Molekularnej

Narodowy Instytut Leków

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana magistra Michała Burmistrza „Charakterystyka systemu CRISPR-
Cas bakterii gatunku *Porphyromonas gingivalis* szczep W83”**

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo dziekana Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 27.03.2017, z prośbą o wykonanie niniejszej recenzji. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Pyrcia w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Rozprawa została zaprezentowana w formie, którą można opisać, jako formę pomiędzy rozszerzonym manuskrytem publikacji a klasyczną rozprawą doktorską. Na taką opinię wpływa głównie sposób prezentacji Materiałów i Metod. Praca zawiera kolejno: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis treści, wprowadzenie (odpowiednik klasycznego wstępu), cele pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski, spis literatury, dwa załączniki, spis rycin i spis tabel.

Jak zwykle w tego typu obszernej pracy w tekście znalazły się drobne błędy językowe, redakcyjne i niefortunne określenia. Ponieważ w trybie przygotowania i oceny rozprawy, po złożeniu pracy do recenzji nie ma możliwości jej korekty pod względem językowym, wspomnę tylko o jednym z błędów, który zawsze odnajduję w tekstach pisanych po polsku. Robię to wyłącznie w celu edukacyjnym i mam nadzieję, że choć drobna grupa doktorantów tłumnie przychodzących na obrony zapamięta moją uwagę.

DNA (i RNA) to kwas nukleinowy, czyli ten (DNA) kwas a nie to (DNA) kwas. Powinno się więc używać określenia oczyszczony RNA a nie oczyszczone RNA, matrycowy cDNA, plazmidowy cDNA itd.

Wstęp/Wprowadzenie na 15 stronach opisuje zasadę działania, strukturę i klasyfikację systemów CRISPR-Cas oraz przedstawia krótki opis znaczenia *Porphyromonas gingivalis* jako jednego z głównych patogenów wywołujących choroby przyzębia i opis zidentyfikowanych do tej pory systemów CRISPR-Cas w *P. gingivalis*. Wstęp jest zwięzły, przejrzysty i zawiera informacje niezbędne do zrozumienia treści rozprawy. Warto w tym miejscu wspomnieć, że doktorant wraz z promotorem jest autorem artykułu przeglądowego dotyczącego działania systemów CRISPR-Cas. Wstęp rozprawy zawiera uaktualnione dane na temat systemów CRISPR-Cas jak np. nowa klasyfikacja tych systemów.

Po Wprowadzeniu, doktorant wymienia cele swojej pracy. Doktorant postawił sobie za zadanie (i) identyfikację elementów systemu CRISPR-Cas w szczepie W83 *P. gingivalis*; (ii) charakterystykę funkcjonalności systemu CRISPR-Cas; (iii) opis procesu dojrzewania cząsteczek crRNA; oraz (iv) opis roli sekwencji i struktury drugorzędowej fragmentu R w aktywności systemu CRISPR-Cas w szczepie W83 *P. gingivalis*.

Rozdział Materiały i Metody najbardziej odbiega od rozprawy doktorskiej w klasycznym znaczeniu i bardziej przypomina fragment publikacji. Dodatkowo rozdział ten zawiera duże fragmenty, które powinny znaleźć się raczej w rozdziale Wyniki. Na przykład podrozdział 3.5 jest zatytułowany „Plazmidy zawierające elementy proto-S” i zamiast opisywać po kolei konstrukcję plazmidów zawierających elementy proto-S, podaje uzasadnienie strategii eksperymentalnej jak wybór koniugacji do wprowadzania plazmidu do *P. gingivalis*, czy zasadę detekcji plazmidów, które niosą element proto-S. W wyniku takiego sposobu opisu umyka część szczegółów eksperymentalnych jak np. stężenie selekcyjne antybiotyku, które nigdzie nie jest podane, czy podłoże, na jakie wysiewano bakterie po transformacji. Podobne informacje, opisujące raczej powody wykonania określonych eksperymentów, a nie techniczny opis, znalazły się w kolejnych podrozdziałach Materiałów i Metod.

Techniki użyte przez doktoranta w trakcie realizacji prac eksperymentalnych obejmują

1. Analizy in silico takie jak identyfikacja elementów systemów CRISPR-Cas w genomie, ustalenie struktury crRNA czy dopasowanie sekwencji CRISPR30 do transkryptomu *P. gingivalis* W83;
2. Analizy transkrypcji typu Northern;
3. Ustalanie poziomu transkrypcji przy użyciu ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR);

4. Konstrukcje szeregu plazmidów i zastosowanie technik inżynierii genetycznej w celu konstrukcji szczepów *P. gingivalis*;

Wyniki zgodne są z wyznaczonymi celami pracy i opisują kolejno:

- (i) analizę bioinformatyczną występowania elementów systemów CRISPR-Cas w genomie *P. gingivalis* W83;
- (ii) Analizę transkrypcji rejonów macierzy CRISPR;
- (iii) Ustalenie roli macierzy CRISPR₃₀ w aktywności systemów Cas typu I-C i III-B oraz wykazanie roli sekwencji PAM w funkcjonowaniu systemu I-C;
- (iv) Wykazanie braku aktywności CRISPR₃₀ względem RNA;
- (v) Ustalenie struktury crRNA CRISPR₃₀;
- (vi) Konstrukcję mutantów *P. gingivalis* zawierających zmodyfikowany region CRISPR₃₀;
- (vii) Analizę dojrzewania crRNA;
- (viii) Analizę roli crRNA w aktywności systemu CRISPR-Cas.

Rozprawa częściowo zawiera wyniki opublikowane w recenzowanym czasopiśmie, co potwierdza tylko ich wartość merytoryczną (Burmistrz M, Dudek B, Staniec D, Rodriguez Martinez JI, Bochtler M, Potempa J, Pyrc K. Functional Analysis of Porphyromonas gingivalis W83 CRISPR-Cas Systems. J Bacteriol. 2015 Aug;197(16):2631-41).

Wyniki opisane są w wyczerpujący i przejrzysty sposób, w tej części pracy znajduje się szereg schematów pozwalających na dokładne prześledzenie i podsumowanie wykonanych eksperymentów, których przykładem może być Rycina 8 czy też Rycina 13. Nie jest jednak dla mnie jasne, dlaczego dane przedstawiające wyniki analizy funkcjonalnej mutantów *P. gingivalis* W83 zostały zawarte w Załączniku 2, zamiast stanowić część Wyników. Praca pokazuje duże zaangażowanie badawcze doktoranta, mimo że jest dość zwięzła. Przedstawiono starannie przemyślany zestaw eksperymentów, prowadzący od identyfikacji sekwencji do wykazania funkcjonalności systemu.

Dyskusja w zwięzły sposób podsumowuje wyniki i przedstawia je w odniesieniu do danych literaturowych. Doktorant omawia potencjalną rolę systemu CRISPR-Cas w *P. gingivalis* W83, jego biogenezę i funkcjonalność. Mam w związku z tym prośbę do doktoranta o spekulacje na temat możliwej roli badanego systemu lub systemów CRISPR-Cas w regulacji ekspresji genów.

Moje kolejne pytanie odnosi się do dostępnej dla *P. gingivalis* puli mobilnych elementów genetycznych. Jak wspomina autor rozprawy, nie opisano do tej pory fagów *P. gingivalis*, czy fagi zostały opisane dla innych bakterii należących do czerwonego kompleksu? Czy w bakteriach należących do czerwonego kompleksu odkryto naturalne plazmidy, i czy w genomach odnaleziono transpozony i sekwencje insercyjne? Zaskakujące jest dla mnie wykrycie podobieństwa elementów S do DNA bakterii zasiedlających układ pokarmowy i brak wykrytego podobieństwa do fagów/mobilnych elementów genetycznych/genomów innych bakterii odnajdywanych w podobnej do *P. gingivalis* niszy jak np. paciorkowce.

Podsumowanie

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pana magistra Michała Burmistrza w powstanie rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pana magistra Michała Burmistrza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a first name and a last name, written in a cursive style.