



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgra. Łukasza Gajdy

pt.

Pozycja troficzna wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) w kontekście badań molekularnych

przygotowanej pod kierunkiem Promotora – prof. dr hab. Piotra Świątka
oraz

Promotora pomocniczego – dr hab. Agaty Daszkowskiej-Golec, prof. UŚ

z

Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Podstawą wydania opinii jest pismo dra Mariusza Kanturskiego, prof. UŚ – Dyrektora Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z dnia 5-go lipca 2024r. (RPW/11606/2024 N) i dokumentacja w postaci papierowej i elektronicznej wersji pracy doktorskiej.

Mgr Łukasz Gajda przedstawił do oceny rozprawę doktorską pt.: **"Pozycja troficzna wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) w kontekście badań molekularnych"**, składającą się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2017–2024, w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) posiadających wskaźnik oddziaływania Impact Factor (IF):

1. **Gajda, Ł.**; Gorgoń, S.; Urbisz, A.Z. 2017. Food Preferences of Enchytraeids, *Pedobiologia*, 63:19-36. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.06.002>. IF= 2,0; 70 pkt. MNiSW
2. **Gajda, Ł.**; Daszkowska-Golec, A.; Świątek, P. 2024. Discovery and characterization of the α -amylases cDNAs from *Enchytraeus albidus* shed light on the evolution of "Enchytraeus-Eisenia type" Amy homologs in Annelida. *Biochimie*, 221:38-59, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.01.008>. IF=3,3; 100 pkt. MNiSW
3. **Gajda, Ł.**; Daszkowska-Golec, A.; Świątek, P. 2024. Trophic Position of the White Worm (*Enchytraeus albidus*) in the context of Digestive Enzyme Genes Revealed by Transcriptomic Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 25:4685. <https://doi.org/10.3390/ijms25094685>. IF=4,9; 140 pkt. MNiSW

Łączny IF₂₀₂₄ prac zaliczonych do ocenianego cyklu jest wysoki i wynosi IF = 10,2 (310 pkt MNiSW).





Przedstawione prace są trój-autorskie, a mgr Łukasz Gajda jest pierwszym i w dwóch pierwszych korespondencyjnym autorem. Według załączonych oświadczeń, wkład Doktorantka w powstanie publikacji był wiodący i polegał na ustaleniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, wykonaniu analiz laboratoryjnych, przygotowaniu publikacji, korekcie manuskryptów oraz sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów na wszystkich etapach recenzji. Pozostali współautorzy określili swój udział w powstanie publikacji i podpisując oświadczenia zaakceptowali wiodący wkład Doktoranta w powyższy cykl publikacji przedłożony jako rozprawa doktorska.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej, zbiór trzech publikacji jest poprzedzony **I. Autoreferatem Rozprawy** w języku polskim, który zawiera: **1. Wprowadzenie**, **2. Cel rozprawy doktorskiej, hipotezy badawcze i etapy prac badawczych**, **3. Materiał i metody**, **4. Omówienie wyników i wniosków** oraz **5. Literatura**. W części drugiej pracy **II. Publikacje wchodzące w skład rozprawy** Autor zamieścił cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej a w części trzeciej: **III. Oświadczenia współautorów publikacji**. Streszczenia w języku polskim i angielskim stanowią załączniki do elektronicznej części pracy. Publikacje są ułożone chronologicznie, zgodnie z kolejnością opublikowania. Całość przedstawionej do recenzji dysertacji liczy 129 stron. Publikacje wraz ze zwięzłym wprowadzeniem, omówieniem najważniejszych wyników i wniosków stanowią istotę nowoczesnej pracy doktorskiej. Praca ma przejrzystą, nieprzeładowaną strukturę i jest napisana poprawnym językiem naukowym. Wszystkie publikacje składające się na dysertację doktorską ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych, w których już wcześniej redakcje czasopism i recenzenci dokonali ich oceny merytorycznej. Tematyka zaliczonych do cyklu prac jest spójna i dotyczy preferencji i pozycji troficznej wazonkowca białego. Pierwsza z publikacji jest artykułem przeglądowym. Dwie pozostałe to oryginalne prace badawcze.

Podsumowując formalną ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam, że posiada ona właściwą strukturę, została bardzo dobrze udokumentowana, jest napisana poprawnym językiem naukowym i w pełni spełnia wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

ZNACZENIE PODJĘTEJ PROBLEMATYKI BADAWCZEJ

Podjęte przez Doktoranta badania posiadają nie tylko ważny aspekt poznawczy/naukowy ale również praktyczny. Wazonkowiec biały (*Enchytraeus albidus* Henle, 1837) budzi zainteresowanie naukowców ze względu na duże znaczenie ekonomiczne. Wazonkowce preferują siedliska bogate w materię organiczną, gdzie mogą występować masowo. Ich zagęszczenie może sięgać ponad 300 000 osobników/m². Zasadlają różne siedliska np. strefy przybrzeżne mórz i gleby bogate w materię organiczną oraz składowiska kompostu. Wazonkowce są zaangażowane w wiele ważnych procesów glebowych: dekompozycję martwej materii organicznej i powstawanie próchnicy, tworzenie struktury gleby oraz regulację aktywności i rozprzestrzenianie się mikroorganizmów glebowych. Organizmy te wykorzystuje się do produkcji żywego, wysokobiałkowego pokarmu w makroskali na potrzeby akwakultury, szczególnie w hodowli ryb jesiotrowatych.

Chociaż wazonkowce odgrywają znaczącą rolę w wielu ekosystemach glebowych, czasami nawet większą niż dżdżownice, pozostają wciąż słabo poznaną grupą zwierząt w zakresie biologii i ekologii troficznej. Często status troficzny bezkręgowców glebowych jest bardzo trudny do określenia, ponieważ zastosowanie metod klasycznych, takich jak obserwacja behawioru odżywiania, analiza mikroskopowa zawartości przewodu pokarmowego, określenie aktywności enzymów w homogenatach tkankowych, hodowle na różnych źródłach pożywienia lub testy wyboru źródła pokarmu dostarczają jedynie wycinkowej informacji na temat całego procesu odżywiania. Ze względu na to, zastosowanie najnowszych narzędzi biologii molekularnej pozwala na bardziej precyzyjne i kompleksowe przeanalizowanie profilu enzymatycznego organizmów, które mogą opierać swój metabolizm o różne poziomy troficzne.



ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

I. Autoreferat rozprawy

Na początku dysertacji Autor zamieścił *Wprowadzenie* do problematyki badawczej, w której przedstawił charakterystykę rodziny Enchytraeidae oraz budowę układu pokarmowego wazonkowców, opisał również znaczenie taksonomiczne, naukowe i ekonomiczne wazonkowca białego. Na koniec rozdziału Doktorant rozwinął zagadnienie bioróżnorodności w glebowych sieciach troficznych i skupił się słusznie na kryptycznej różnorodności bezkręgowców i zwrócił uwagę na fakt, że oczekuje się, iż gatunki bezkręgowców podobnych morfologicznie będą podobne również ekologicznie, *"ale podobieństwo morfologiczne niekoniecznie ilustruje ekologiczną równowagę. Gatunki kryptyczne bowiem mogą różnić się pomiędzy sobą w niektórych właściwościach ekologicznych i fizjologicznych..."*. Autor przedstawił tu również konceptualny model glebowej sieci troficznej, w którym wyróżnił saprofagi pierwszorzędowe (wykorzystujące materiał roślinny słabo skolonizowany przez mikroorganizmy) i drugorzędowe (wykorzystujące materiał roślinny wstępnie zdegradowany/dytrytus przez mikroflorę i/lub mikroorganizmy jako źródło pożywienia) oraz drapieżniki, ponad to: szczątki roślinne, detrytus oraz mikroorganizmy. Powyższe informacje stanowią bardzo dobre wprowadzenie do podjętych badań i uzasadniają ich cel.

Drugi rozdział Autoreferatu to *Cel rozprawy doktorskiej, hipotezy badawcze i etapy prac badawczych*. Autor zastosował tu nietypowe podejście, przedstawiając najpierw cel rozprawy doktorskiej, następnie dwie hipotezy badawcze, które zostały sformułowane po dogłębnej analizie literatury przedstawionej w pierwszej pracy przeglądowej zaliczonej do rozprawy (GAJDA i in. 2017). Celem rozprawy doktorskiej było ustalenie pozycji troficznej wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) na podstawie informacji dotyczących jego zdolności trawiennych, uzyskanych dzięki wykorzystaniu klasycznych, jak i nowoczesnych technik biologii molekularnej, w tym dzięki profilowaniu transkryptomu. Zarówno cel pracy jak hipotezy badawcze zostały jasno sformułowane a osiągnięcie celu pracy i weryfikacja hipotez badawczych odbyła się z wykorzystaniem klasycznych i najnowszych metod biologii molekularnej. W hipotezie 1-jej mgr Ł. Gajda założył, że wazonkowiec biały *"...nie wykazuje endogennej ekspresji genów, które kodują celulazy, dlatego nie należy do grupy saprofagów pierwszorzędowych."* Autor założył również, że badany wazonkowiec *"...wykazuje ekspresje genów, które kodują enzymy trawienne zaangażowane w troficzną lizę bakterii lub grzybów, takie jak np. hydrolazy mureinowe lub chitynazy, i dlatego należy do grupy saprofagów drugorzędowych."* W tej części pracy Autor po krótko scharakteryzował następujące etapy prac badawczych:

Etap 1: krytyczna analiza stanu wiedzy na temat preferencji pokarmowych rodziny Enchytraeidae i pozycji troficznej jej przedstawicieli, która została opublikowana w artykule przeglądowym zaliczonym do dysertacji;

Etap 2: amplifikacja transkryptów wybranych genów enzymów trawiennych u wazonkowca białego za pomocą metody PCR z odwrotną transkrypcją z wykorzystaniem wysoce zdegenerowanych starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych dla innych organizmów, tzw. "gene fishing";

Etap 3: a) hodowla monohaplotypowej linii laboratoryjnej PL-A wazonkowca białego z pojedynczego kokonu (jednorodnej pod względem mitochondrialnego genu podjednostki I oksydazy cytochromu c (COI), b) uzyskanie transkryptomu z powyższej linii, c) szczegółowa analiza bioinformatyczna.

Wartością dodaną pracy jest realizacja dodatkowych zadań badawczych, nie wynikających bezpośrednio z celu pracy, a mianowicie analiza wyników w kontekście filogenetycznym i ewolucyjnym. Analizy te, zdaniem Autora i również moim, *"przyczyniły się do sformułowania głębszych wniosków, poszerzyło możliwości publikacyjne uzyskanych wyników i wytyczyło kierunki nowych badań naukowych."*



W rozdziale **Materiały i metody** Autor przedstawił na wstępie sposoby pozyskiwania materiału biologicznego do analiz, opisał warunki hodowli wazonkowca białego, metodę uzyskania linii monohaplotypowej i określania jej czystości genetycznej. Mając na względzie kryptyczną różnorodność *E. albidus*, Doktorant poddał losowo wybrane osobniki barkodowaniu DNA w oparciu o amplifikację genu COI (fragmentów Folmera – 658 pz), co pozwoliło potwierdzić mu przynależność taksonomiczną hodowanych wazonkowców a uzyskane sekwencje (haplotypy PL-A, PL-B, PL-C) zostały zdeponowane w GeneBank. W kolejnych podrozdziałach Doktorant opisał metody PCR-RF-SSCP, izolację RNA oraz dwuetapowy RT-PCR, który dał pozytywny rezultat w przypadku jednego enzymu trawiennego – α -amylazy, identyfikację końca 3' i 5' cDNA w celu określenia pełnej sekwencji kodującej α -amylazy, klonowanie kompletnej sekwencji α -amylazy I. Właściwą izolację RNA na potrzeby RNA-seq oraz sekwencjonowanie transkryptomu zlecono podmiotom zewnętrznym. Asemblacji transkryptomu dokonano metoda *de novo* ze względu na brak genomu referencyjnego. W kolejnej części Autor scharakteryzował zastosowane analizy filogenetyczne i analizy bioinformatyczne, które zestawiał w czytelnej tabeli.

Podsumowując rozdział warto zauważyć, że wykorzystane przez Doktoranta metody zostały dobrane prawidłowo i pozwoliły na osiągnięcie zamierzonego celu badań i weryfikację hipotez badawczych. Dodatkowo, rozdział jest opatrzony bardzo czytelnymi schematami poszczególnych analiz, elektroforogramami i rycinami, które w jasny sposób ilustrują zastosowane procedury.

W rozdziale **Omówienie wyników i wniosków** Autor przedstawił główne osiągnięcia poszczególnych prac wchodzących do cyklu pracy doktorskiej. W przypadku **publikacji 1-ej** (GAJDA i in. 2017), która ma charakter pracy przeglądowej, oprócz szerokiego przeglądu literatury, przeprowadzono dwa eksperymenty obserwacyjno-behawioralne wazonkowca białego – oddziaływanie grupy głodzonych osobników na wycięty fragment pleszanki (*Pellia* sp.) na płycie agarowej oraz rozkład suszonego liścia bzu czarnego (*Sambucus nigra*) podczas obecności i nieobecności wazonkowca. Na podstawie przeglądu literatury i obserwacji dokonanych podczas dwóch powyższych eksperymentów Doktorant przedstawił pięć bardzo rozbudowanych wniosków wstępnych, które w skróconej przeze mnie formie brzmią następująco:

- Wazonkowce można zaklasyfikować jako saprofagi pierwszorzędowe albo drugorzędowe czyli jest to grupa bezkręgowców wykazująca zróżnicowane strategie odżywiania.
- Wazonkowce nie są pasożytami roślin.
- Wazonkowce nie produkują celulaz albo mają niewielkie zdolności celulolityczne, które mogą być przypisywane również mikroorganizmom.
- Hydrolazy mureiny występujące w jelicie wazonkowców mogą przypuszczalnie uczestniczyć w procesie trawienia ścian komórkowych bakterii.
- Wymagane są dalsze badania nad ekologią troficzną wazonkowców z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej.

Wnioski wstępne, które Doktorant sformułował na podstawie zebranej literatury i obserwacji własnych dały podwaliny do stworzenia hipotez badawczych i doboru odpowiednich metod molekularnych do ich weryfikacji. W dalszej części badań, przy zastosowaniu metod klasycznych, dokonano amplifikacji CDS wybranych genów enzymów trawiennych metodą "gene fishing" z wykorzystaniem wysoce zdegenerowanych starterów, które zakończyło się powieleniem i scharakteryzowaniem pełnej sekwencji tylko jednego enzymu trawiennego α -amylazy I. Na podstawie przeprowadzonych dalszych analiz w **publikacji 2-ej** (GAJDA i in. 2024a) Autor przedstawił szereg dziewięciu wniosków, które w skróconej formie można przedstawić następująco:



- U wazonkowca białego ulega ekspresji drugi, paralogiczny gen kodujący α -amylazę. Gatunek ten posiada więc dwa geny (geny *AMY I* i *AMY II*) kodujące tę glikozydazę zaliczaną do amylaz typu *Enchytraeus-Eisenia*.
- Geny *AMY* wydają się jedynymi genami kodującymi α -amylazy u wazonkowców z rodzaju *Enchytraeus*, w przeciwieństwie do wazonkowców z rodzaju *Mesenchytraeus*, które posiadają również α -amylazy typu *Lingula-Platynereis*.
- *AMY I* w przeciwieństwie do *AMY II*, wydaje się genem wysoce polimorficznym i wielokopijnym.
- Budowa domen białkowych Amy I/Amy II jest zgodna ze schematem „ABC” budowy innych amylaz u zwierząt.
- Adaptacyjne znaczenie Amy II u pierścienic może być związane z wykorzystywaniem skrobi i podobnych polisacharydów, ponieważ amylaza ta nie posiada motywu aminokwasowego Gly-His-Gly-Ala (GHGA) w regionie zwanym pętlą elastyczną i może wykazywać dodatkową aktywność 4- α -glukanotransferazy (EC 2.4.1.25), podobnie jak niektóre α -amylazy owadów.
- Prawdopodobnie delekcja motywu GHGA w pętli elastycznej Amy II była związana z tranzycją pierścienic ze środowiska morskiego do słodkowodnego i lądowego.
- Utrata motywu GHGA w α -amylazie jest cechą pierwotną dla siodełkowców (Clitellata).
- Homologi α -amylazy typu *Enchytraeus-Eisenia* zidentyfikowano w bazalnych liniach rozwojowych pierścienic, co wskazuje na ancestralne pochodzenie Amy w obrębie typu.
- Chociaż przebieg filogenezy oparty na sekwencjach białkowych Amy różnił się od ogólnie akceptowanych hipotez filogenetycznych pierścienic, to wykazywał znaczące podobieństwo z ostatnimi wynikami analiz filotranskryptomicznych i filogenomicznych w odniesieniu do pozycji i relacji kilku problematycznych taksonów (*Dimorphilus*, *Hrabeiella* i *Aeolosoma*).

Podsumowując analizę wyników uzyskanych w **publikacji 2-ej**, Autor słusznie zwrócił uwagę na adaptacyjne znaczenie obecności u zwierząt kopii genów tych samych enzymów trawiennych w kontekście ich zróżnicowanej specyficzności substratowej. Moim zdaniem można to zagadnienie jeszcze bardziej rozszerzyć o wyspecjalizowanie różnych form tego samego enzymu w zależności od części układu pokarmowego i panującego tam pH czy o przystosowanie do zmiennych warunków temperaturowych czy lokalizacji formy enzymu w komórce – często w komórkach zwierząt stwierdza się bowiem cytozolowe i związane z błonami formy hydrolaz. Można by to min. wykazać przez wykonanie klasycznych analiz biochemicznych, takich jak określenie optimum pH i temperatury czy rozdzielenia frakcji komórkowych przez ultrawierowanie i określenia w nich aktywności enzymu. Nie było to jednak celem tej pracy.

Opisując najważniejsze wyniki zawarte **publikacji 3-ej** (GAJDA i in. 2024b) mgr Łukasz Gajda skupił się na przeanalizowaniu profilu enzymatycznego wazonkowca białego wykorzystując dane transkryptomiczne uzyskane przez siebie dla szczepu PL-A w porównaniu z danymi ze szczepów G i N tolerujących zamrażanie oraz danymi z innych siodełkowców (w tym innych wazonkowców). Swoje podsumowanie przedstawił w postaci sześciu rozbudowanych wniosków, które po krótko można przedstawić następująco:

- Analiza RNA-Seq dla *E. albidus* umożliwiła zidentyfikowanie co najmniej 30 glikozydaz, 4 proteaz serynowych, 10 karboksypeptydaz A/B, 3 aminopeptydaz N, 4 lipaz i jednej fosfolipazy A2.
- U *E. albidus* ulegają ekspresji zarówno enzymy celulolityczne (endo- β -1,4-glukanazy) oraz zaangażowane w trawienie mikroorganizmów – lizozym Ealb-iLys, trawienny lizozym typu "i", oraz dwie chitynazy – wazonkowiec biały łączy więc cechy zarówno saprofagów pierwszorzędowych, jak i saprofagów drugorzędowych – jest saprofagiem pośrednim.



- Endo- β -1,4-glukanazy występujące u *E. albidus* są homologami cellulaz należących do rodziny hydrolaz glikozydowych GH9, wcześniej opisanych u niektórych gatunków dżdżownic, wazonkowców i u glebowego wieloszczeta, *Hrabeiella periglandulata*.
- U *E. albidus* multifunkcyjny lizozym typu "i" (EalbiLys) należący do rodziny hydrolaz glikozydowych GH22i prawdopodobnie uczestniczy w lizie bakterii – posiada domenę typu destabilaza-lizozym, charakteryzującą się podwójną aktywnością: lizozymu oraz destabilazy i zawiera dodatkowo domenę SH3b, która odpowiada prawdopodobnie za rozpoznanie peptydoglikanu i wiązanie się enzymu ze ścianą komórkową bakterii.
- Ekspresja bliskich ortologów lizozymu typu *Enchytreus-Eisenia* z domeną SH3b może być potencjalnym molekularnym markerem bakteriożerności u siodełkowców.
- β -N-acetyloglukozaminidaza (Endo- β -NAGaza; hydrolaza mureiny) jest wewnątrzkomórkowym enzymem zlokalizowanym w cytoplazmie, który nie ulega sekrecji do światła układu pokarmowego. Nie jest więc enzymem trawiennym zaangażowanym w lizę troficzną bakterii u *E. albidus*.

W podsumowaniu rozdziału, Autor słusznie podkreślił, że "metody molekularne, zwłaszcza RNA-Seq, w połączeniu z szerokim wachlarzem metod bioinformatycznych, mogą być wysoce przydatne w badaniach pozycji troficznej zwierząt niemodelowych." i do tej pory potencjał analiz RNA-Seq nie był praktycznie wykorzystywany przez ekologów badających sieci troficzne organizmów glebowych. Doktorant zwrócił również uwagę na fakt, że wcześniej badacze klasyfikowali wazonkowce do saprofagów pierwszo- lub drugorzędowych z wykorzystaniem metody stabilnych izotopów ^{13}C i ^{15}N . Najnowsze badania Korobuszkina i in. (2024), w których przeanalizowano 16 gatunków wazonkowców za pomocą powyższej metody wykazały, że *E. albidus* wraz z innymi wazonkowcami jest saprofagiem pierwszorzędownym zdolnym jednocześnie do lizy ścian komórek bakteryjnych. Spostrzeżenia te w pełni pokrywają się z głównym wnioskiem recenzowanej pracy doktorskiej tj. wnioskiem o pozycji pośredniej wazonkowca białego pomiędzy pierwszorzędownymi i drugorzędownymi saprofagami.

Oceniając ten rozdział stwierdzam, że wnioski przedstawione przez Doktoranta są wnikliwe i prawidłowe. W moim przekonaniu są jednak czasem za bardzo rozbudowane i raczej stanowią rodzaj podsumowania najważniejszych wyników. Zabrakło mi też silnego zaakcentowania głównego wniosku pracy, że wazonkowiec biały reprezentuje pośrednią pozycję troficzną pomiędzy pierwszo- i drugorzędownymi saprofagami w kontekście weryfikacji hipotez badawczych. Owszem wniosek ten znalazł się w tekście na końcu rozdziału ale bez odniesienia do hipotez badawczych tej pracy. Warto by było bardziej zaakcentować to podczas obrony pracy doktorskiej.

W rozdziale piątym (5. *Literatura*) Autor zamieścił alfabetycznie zestawiony spis literatury obejmujący 84 pozycje. Poza dwoma pozycjami polskojęzycznymi, wszystkie pozostałe prace są angielskojęzyczne. Spis został sporządzony rzetelnie i zawiera zarówno pozycje najnowsze jak również te z poprzedniego stulecia.

II. Publikacje wchodzące w skład rozprawy

W drugiej części rozprawy Autor zamieścił PDFy publikacji wchodzących w skład rozprawy poprzedzone spisem tych prac. Jak wspomniałam na wstępie, wszystkie publikacje składające się na dysertację doktorską ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR, w których już wcześniej redakcje czasopism i recenzenci dokonali ich oceny merytorycznej. Prace wchodzące w skład cyklu są pracami bardzo obszernymi. W obu pracach oryginalnych surowe dane analityczne zostały bardzo dobrze udokumentowane i zestawione w suplementach. W przypadku publikacji GAJDA i in. 2024a nowe sekwencje nukleotydowe uzyskane dla genów kodujących α -amylazę zostały zdeponowane



w bazie GeneBank (OQ830661–OQ830669 i OQ843025–OQ843027) zaś surowe sekwencje RNA-seq wygenerowane na potrzeby tych badań zostały złożone w archiwum odczytów sekwencji (SRA) w NCBI (BioProject nr PRJNA956247). Suplement dotyczący pracy Gajda i in. 2024b został zapisany pod linkiem: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25094685/s1>.

III. Oświadczenia współautorów

W trzeciej części rozprawy doktorskiej Autor zamieścił oświadczenia wszystkich współautorów zaliczonych do cyklu prac. Współautorzy określili swój udział w powstanie publikacji i, jak już wspomniałam na wstępie, wskazali na wiodący wkład Doktoranta w cykl publikacji przedłożony jako rozprawa doktorska.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca doktorska posiada dużą wartość merytoryczną, zawiera dogłębne analizy wyników uzyskanych klasycznymi i najnowocześniejszymi metodami molekularnymi, w tym analizę transkryptomu profilowaną na enzymy trawienne wazonkowca białego, co umożliwiło dokładne określenie jego pozycji troficznej jako saprofaga pośredniego. Uzyskane wyniki pozwoliły osiągnąć w pełni założony cel rozprawy i zweryfikować hipotezy badawcze. W zasadzie trudno wskazać w stosunku do recenzowanej rozprawy jakiegokolwiek zarzuty, poza nielicznymi błędami natury redakcyjnej wynikających ze skrótów myślowych, zapożyczeń z języka angielskiego itp, np. Figura 1–9 zamiast po prostu Rycina 1–9, "Geny *Amy* wydają się być jedynym występującym typem α -amylaz..." zamiast "Geny *Amy* wydają się być jedynym typem genów kodujących α -amylazy..." czy "...hydrolazy mureiny mogą być enzymami uczestniczącymi w procesie trawienia bakterii w jelicie wazonkowców." zamiast "...hydrolazy mureiny mogą być enzymami uczestniczącymi w procesie trawienia ściany komórkowej bakterii w jelicie wazonkowców."

W wyniku jedynie ciekawości i powinności recenzenta oraz chęci dyskusji z Doktorantem podczas publicznej obrony, chciałabym prosić o ustosunkowanie się do następujących pytań i sugestii podczas obrony:

1. Ponieważ w Autoreferacie jest to trochę niejasne, prosiłabym o wytłumaczenie podczas obrony: w jaki sposób Doktorant wykazał, że β -N-acetyloglukozaminidaza (Endo- β -NAGaza) jest wewnątrzkomórkowym enzymem zlokalizowanym w cytoplazmie, który nie ulega sekrecji do światła układu pokarmowego i nie jest enzymem trawiennym zaangażowanym w liżę troficzną bakterii u *E. albidus*?
2. Czy Doktorant rozważał zastosowanie klasycznych metod biochemicznych do określenia aktywności i właściwości enzymów trawiennych u wazonkowca białego? Prosiłabym o podanie ewentualnych argumentów za i przeciw. Czy tego typu badania były prowadzone w przeszłości przez innych badaczy u wazonkowców?
3. Mgr Łukasz Gajda wykorzystał klasyczne techniki biologii molekularnej, jak i analizy transkryptomu przy zastosowaniu wielorakich narzędzi bioinformatycznych w celu ustalenia pozycji troficznej wazonkowca białego. Czy w przyszłości Doktorant planuje dalsze badania uzupełniające, np. dotyczące proteomu? Powszechnie wiadomo, że nie zawsze następstwem ekspresji genu jest ekspresja białka, które koduje. Czy zdaniem Doktoranta dalsze analizy z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) do analizy fosfoproteomu nie byłyby dobrym rozwiązaniem? Należy zauważyć, że podejście fosfoproteomiczne dostarcza wskazówek, jakie białko lub szlak mogą zostać aktywowane, ponieważ zmiana stanu fosforylacji prawie zawsze odzwierciedla zmianę aktywności białka.



Wyżej wymienione uwagi, pytania czy sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej niniejszej dysertacji oraz bardzo wysokiej oceny, jaką z pełną odpowiedzialnością stawiam pracy doktorskiej pana mgra. Łukasza Gajdy.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wnosi w wielu aspektach nowy wkład w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej. Cykl publikacji wraz z poprzedzającym go Autoreferatem stanowią istotę nowoczesnej pracy doktorskiej o przejrzystej strukturze. Artykuły naukowe zaliczone do cyklu prac zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR i posiadają wysoki wskaźnik oddziaływania IF. W wyniku przeprowadzenia bardzo szerokich analiz z zastosowaniem klasycznych i najnowocześniejszych metod molekularnych mgr Łukasz Gajda w pełni osiągnął zamierzony cel badań a nawet w wielu aspektach go przekroczył.

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska autorstwa **mgr. Łukasza Gajdy** w postaci cyklu powiązanych tematycznie trzech publikacji zebranych pod wspólnym tytułem: **"Pozycja troficzna wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) w kontekście badań molekularnych"** stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe, wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny i spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim oraz odpowiada warunkom określonym w **art. 187, ust. 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742)**.

W związku z powyższym zwracam się do **Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach** o dopuszczenie **mgr. Łukasza Gajdy** do dalszych etapów postępowania o nadanie **stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**.

Ze względu na dużą wartość merytoryczną rozprawy, obszerny zakres badań i wykorzystanych metod badawczych rozprawa jest opracowaniem kompletnym i mimo różnorodności użytych metod i mnogości uzyskanych wyników, napisana jest poprawnym językiem i posiada uporządkowaną strukturę. Świadczy to o dużej dojrzałości i samodzielności naukowej Doktoranta zarówno w części laboratoryjnej jak podczas pisania pracy, dobrego przygotowania metodycznego oraz pracowitości i rzetelności. Potwierdza to także wartościowy dotychczasowy dorobek publikacyjny Doktoranta. Biorąc to pod uwagę uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska pana Łukasza Gajdy zasługuje na wyróżnienie stosowną nagrodą. Niestety, zgodnie z Zarządzeniem nr 188 Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z dnia 28 października 2021 r. w sprawie określenia warunków uznania rozprawy doktorskiej za wyróżniającą, praca nie spełnia jednego z warunków, ponieważ powstawała dłużej niż pięć lat. Gdyby jednak istniały nieznanne mi odstępstwa od tego zarządzenia np. związane z długotrwałym okresem pandemicznym COVID 19 czy też inne, **przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach wniosek o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.**

Margareta Dmitruk

Olsztyn, dnia 28 sierpnia 2024r.