

Streszczenie w języku polskim

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kopik

pt. „Wyspecjalizowane rybosomy u sporulującej laseczki siennej *Bacillus subtilis*”

Bacillus subtilis (laseczka sienna) jest bardzo dobrze zbadaną bakterią Gram-dodatnią i często stosowanym organizmem modelowym. Jest szeroko rozpowszechniony w naturze, a jego głównym miejscem bytowania jest gleba. Cechą charakterystyczną *B. subtilis* jest zdolność do tworzenia endospor, wysoce odpornych form przetrwalnych, umożliwiających przeczekać niekorzystnych warunków środowiskowych. Powstają one w wyniku ściśle koordynowanego przez komórkę, wielogodzinnego procesu zwanego sporulacją, inicjowanego głównie przez głód aminokwasowy oraz odpowiednią gęstość hodowli.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie potrójnego delecyjnego mutantu $\Delta rpmEB\Delta rpmGC\Delta rpsNB$ *B. subtilis* (określanego w niniejszej pracy jako szczep 3KO) w kontekście przeprowadzania przez niego procesu sporulacji, w celu przeanalizowania roli, jaką wyspecjalizowane rybosomy mogą odgrywać podczas tego procesu.

Wyspecjalizowane rybosomy to hipotetyczne subpopulacje rybosomów, które mają różnić się od siebie strukturalnie i funkcjonalnie, a tym samym wpływać na wynik translacji, np. poprzez preferencyjne wiązanie się z konkretnym podzbiorem transkryptów. W ten sposób rybosom zyskuje dodatkową rolę, stając się aktywnym elementem w zarządzaniu przepływem informacji genetycznej, co dodaje nowy poziom w regulacji ekspresji genów. Dowodów potwierdzających istnienie wyspecjalizowanych rybosomów przybywa, jednak hipoteza ta wciąż pozostaje zagadnieniem kontrowersyjnym, głównie przez trudności w udowodnieniu ich odmiennej funkcjonalności. Jest ona badana i weryfikowana zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych.

W pierwszej kolejności dokonano charakterystyki fenotypowej badanych szczepów: WT i 3KO *B. subtilis*. Oba szczepy wykazywały podobny wzrost zarówno w pożywkach bogatych w składniki odżywcze (LB, CH), jak również w ubogich (BMM), na co wskazują ich krzywe wzrostu. Nie różniły się one również wrażliwością na wybrane związki chemiczne, w tym lizozym, antybiotyki (ampicylina, kwas fusydowy, spektynomycyna, tiostrepton),

detergenty (SDS, Tween-20) i sole (Na_2SO_4 , MnSO_4 , ZnCl_2). Ponadto stwierdzono brak różnic w tworzeniu biofilmu, przy czym oba szczepy tworzyły silnie rozbudowane i trwałe biofilmy. Dla dodatkowej weryfikacji poprawności wyników użyto dodatkowego szczepu *B. subtilis* BGSC, który wytwarzał o wiele słabsze i nietrwałe struktury. Zaobserwowano za to różnicę w mobilności szczepów, przy czym 3KO wykazywał znacząco mniejszą mobilność w pożywce półpłynnej o zawartości agaru $\leq 0,33\%$.

Następnie zbadano przebieg procesu sporulacji szczepów *B. subtilis* 3KO i WT poprzez sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) i profilowanie rybosomów (RIBO-seq) oraz obserwacje mikroskopowe. Proces monitorowano przez siedem godzin od indukcji sporulacji, pobierając próbki co godzinę. Różnica w wydajności translacji została wykryta tylko w siódmej godzinie procesu dla 65 genów, w tym dla 38 genów poziom translacji był wyższy w szczepie WT, zaś dla 27 genów był on wyższy w szczepie 3KO. Spośród 65 zidentyfikowanych genów największą grupę o znanej funkcji stanowiły geny związane z tworzeniem płaszcza, zewnętrznej powłoki ochraniającej sporę (15 genów), z czego większość dotyczyła najbardziej zewnętrznej warstwy, zwianej skorupą (11 genów) i niemal wszystkie (13 genów) wykazywały wydajniejszą translację w szczepie WT. Drugą najliczniejszą grupą genów, były ogólne białka stresu (6 genów) i wszystkie wykazywały wydajniejszą translację w szczepie 3KO. Genami o największej różnicy w wydajności translacji (od 7,5 do 5,5) były *yurS* (białko sporulacyjne o nieznannej funkcji), *ylqC* (domniemane białko wiążące RNA), *gyrA* (podjednostka A gyrazy DNA), *yloS* (pirofosfokinaza tiaminy) oraz *mazF* (toksyna, powodująca programową śmierć komórki) i wszystkie wykazywały wydajniejszą translację w szczepie WT.

Do obserwacji mikroskopowych użyto barwników SynaptoRed w celu wizualizacji błon komórkowych; DAPI w celu wizualizacji chromosomu bakteryjnego oraz OPP-Alexa w celu wizualizacji miejsc aktywnej translacji, a także markera molekularnego GFP w fuzji z białkiem rybosomalnym RpsB w celu detekcji lokalizacji rybosomów. W wyniku obserwacji mikroskopowej wykryto subpopulację komórek szczepu 3KO w szóstej godzinie po indukcji sporulacji, która cechowała się mniej wydajną translacją.

Wykryto istotną statystycznie różnicę w wydajności germinacji spor. Średnia wydajność germinacji spor szczepu WT wynosiła $61,5\% \pm 2,98$, zaś dla spor szczepu 3KO

była niemal dwukrotnie mniejsza i wynosiła $30,2\% \pm 12,78$. Różnica to została również potwierdzona w krzywych wzrostu hodowli zapoczątkowanych ze spor.

Z powodu zaobserwowania wyraźnych różnic w germinacji spor, przeprowadzono obserwacje mikroskopowe również dla tego procesu. Obserwacji poddano dojrzałe, całonocne spory przed i po inkubacji w wysokiej temperaturze 90°C przez 40 minut, a także po 30, 60, 90, 120 i 180 minutach od indukcji germinacji. Analiza zdjęć mikroskopowych ujawniła, że po poddaniu spor działaniu wysokiej temperatury, gwałtownie spadał odsetek spor szczepu 3KO, które wykazywały fluorescencję GFP-RpsB. Pomiar intensywności fluorescencji również potwierdził istotną statystycznie różnicę pomiędzy sporami szczepów 3KO i WT dla wszystkich zbadanych punktów czasowych, za wyjątkiem pierwszego z nich, który odpowiadał momentowi sprzed inkubacji w wysokiej temperaturze. Wskazuje to, że spory szczepu 3KO są wrażliwe na działanie wysokiej temperatury, która może powodować denaturację białek w ich rdzeniu, w tym białek RpsB. Jednocześnie procent spor wykazujących niebieską fluorescencję DAPI przed i w momencie indukcji germinacji różnił się pomiędzy szczepami i był niemal o połowę niższy dla szczepu WT, jednak w kolejnych badanych punktach czasowych był do siebie zbliżony w obu szczepach i wykazywał tendencję wzrostową. Może być to spowodowane różnicą w przepuszczalności spor, przy czym spory 3KO byłyby bardziej przepuszczalne dla barwnika DAPI. Zrównanie się odsetek spor szczepu 3KO i WT w wykazywaniu fluorescencji DAPI po 30 minutach od indukcji germinacji może mieć uzasadnienie w rozpoczęciu tego procesu, ponieważ germinujące spory posiadają podobną przepuszczalność, jak te zabite przez wysoką temperaturę (Black & Gerhardt, 1962; Mtime i in., 2017; Trunet i in., 2019). Tłumaczy to również tendencję wzrostową w odsetku spor wykazujących fluorescencję DAPI wraz z postępem germinacji.

W wyniku obserwacji mikroskopowych w intensywności fluorescencji OPP-Alexa, która reprezentuje aktywnie przeprowadzaną translację, wykryto, że spory szczepu 3KO wykazują statystycznie istotnie niższy poziom translacji w 30 minutach oraz w 2 godzinie od indukcji germinacji. Ponadto generalnie widać tendencję wzrostową w intensywności fluorescencji OPP-Alexa wraz z postępem germinacji. Wykryto również różnicę w długości spor pomiędzy szczepami, która po 60 minutach od indukcji germinacji staje się istotna statystycznie. Aspekt długości spor powiązano z różnicą w poziomie translacji, reprezentowaną przez fluorescencję OPP-Alexa.