



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40
fax +48 71 375 76 61

dziekanat.wb@uwr.edu.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl

Wrocław 28.01.2024

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz
Z-d Mikrobiologii Molekularnej
Uniwersytet Wrocławski
dagmara.jakimowicz@uwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kopik pod tytułem „Wyspecjalizowane rybosomy u sporulującej laseczki siennej *Bacillus subtilis*.”

Recenzowana rozprawa doktorska została wykonana Instytucie Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Agaty Starosty. Praca dotyczy bardzo ciekawego i mało poznanego zagadnienia, jakim jest rola wyspecjalizowanych rybosomów w regulacji procesu translacji. W oparciu o wcześniejsze badania promotorki dr hab. Agaty Starosty, mgr Natalia Kopik podjęła się zbadania roli alternatywnych rybosomalnych białek w czasie sporulacji bakterii *Bacillus subtilis*. Aby poznać rolę tych białek Doktorantka przeprowadziła analizy transkrypcyjne oraz translacyjne (profilowanie rybosomów, Ribo-seq) szczepu *B. subtilis* pozbawionego trzech białek rybosomalnych w porównaniu do szczepu dzikiego. Badania te zostały uzupełnione analizą wzrostu i ruchliwości bakterii oraz mikroskopowymi analizami sporulacji i kiełkowania zmutowanego szczepu. Dzięki tak kompleksowym i wszechstronnym analizom mgr Natalii Kopik udało się uzyskać ciekawe wyniki wskazujące na rolę badanych białek w regulacji translacji w kiełkujących sporach. Najważniejsze osiągnięcia Doktorantki to:

- wykazanie, że delecja genów kodujących alternatywne białka rybosomalne nie wpływa na wzrost i sporulację, ale zmienia ruchliwość *B. subtilis*,



- zademonstrowanie, że szczep z potrójną delecją genów kodujących alternatywne białka rybosomalne wykazuje nieznaczne zmiany w profilu transkrypcji i translacji na wczesnych etapach sporulacji i bardziej wyraźne na ostatnim etapie sporulacji,

- udowodnienie, że proces translacji jest zaburzony podczas kiełkowania zarodników szczepu pozbawionego trzech alternatywnych białek rybosomalnych.

Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Wstęp jest niezwykle obszerny – obejmuje on około 100 stron. Znaczną część Wstępu Doktorantka poświęciła procesowi sporulacji *B. subtilis*. Doktorantka we Wstępie bardzo szczegółowo opisała ten proces, nie szczędząc detali dotyczących regulacji aktywności każdego z regulatorów procesu sporulacji. Miało to swoje uzasadnienie w fakcie, że w dalszej części pracy Doktorantka często odwołuje się do poszczególnych białek i etapów procesu sporulacji. W dalszej części Wstępu Doktorantka przedstawiła badania wskazujące na obecność i rolę wyspecjalizowanych rybosomów. Informacje te są nieco fragmentaryczne, ponieważ wiedza na temat aktywnej roli rybosomów w regulacji translacji jest mało udokumentowana. Pomimo to, Autorka wiele uwagi poświęciła dotychczasowym doniesieniom, przedstawiając je bardzo drobiazgowo. Pomimo bardzo rozbudowanego wprowadzenia i bardzo dogłębnego przedstawienia sporulacji *B. subtilis* i gruntownego opisanie operonów rRNA, zabrakło nieco syntetycznych informacji na temat procesu translacji w czasie sporulacji. Przy przedstawianiu bardzo szczegółowych informacji zabrakło też trochę podejścia „od ogółu do szczegółu”, czyli wstępnego ogólnego zarysowania przedstawianego mechanizmu (dotyczy to szczególnie regulacji sporulacji, czy wiązania cynku przez białka rybosomalne). Lektura Wstępu wskazuje, że Doktorantka stanęła przed trudnym zadaniem przedstawieniem wielu obszernych zagadnień i podjęła duży trud, aby opisać je jak najdokładniej. Złożona regulacja sporulacji *B. subtilis* była przedmiotem wielu badań i jest przedstawiona w wielu publikacjach. Jednak w moim odczuciu, zawarcie we Wstępie informacji tylko najbardziej niezbędnych i koniecznych dla zrozumienia dalszych etapów pracy powinno być zasadą, którą należałoby się kierować w przygotowaniu tej części pracy doktorskiej, podobnie jak jest to zasadą podczas przygotowania publikacji. Trzeba jednak zaznaczyć, że czytelność Wstępu znacząco poprawiają liczne, starannie opisane ilustracje.

Hipoteza badawcza jest bardzo klarowna, ale cel pracy mógłby być poparty głębszym i bardziej rozwiniętym uzasadnieniem. Wskazane byłoby dokładniejsze wyjaśnienie przesłanek przemawiających za użyciem szczepu z potrójną delecją genów kodujących alternatywne białka rybosomalne. Proszę Doktorantkę o komentarz na ten temat w czasie publicznej obrony.

Rozdział Materiały zawiera opis używanych szczepów oraz listy używanych odczynników. Niestandardowym podejściem jest brak tabelarycznego zestawienia genotypów używanych szczepów, ale może to być uzasadnione stosunkowo niewielką ich liczbą. Rozdział Metody poprawnie zestawia stosowane techniki badawcze. Warto podkreślić, że Doktorantka wykorzystwała zarówno standardowe metody mikrobiologiczne (analizy wzrostu w warunkach optymalnych i stresowych, badanie ruchliwości komórek), jak również zastosowała analizy transkryptomyczne oraz analizy translacji – profilowanie rybosomów. Co więcej, Doktorantka rozszerzyła swój warsztat badawczy o mikroskopowe analizy sporulacji i kiełkowania. Warto zaznaczyć, że bardzo precyzyjnie opisano liczby powtórzeń wszystkich eksperymentów. Pytanie, które nasunęła mi lektura tego rozdziału jest związane z pomiarem stężenia RNA w lizatach komórkowych. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób oznaczono całkowite stężenie RNA w lizatach, w których obecne było także chromosomalne DNA. Kolejne pytanie nasuwa opis analizy danych – proszę o wyjaśnienie, jak normalizowano zmiany w translacji względem zmian poziomu transkryptu.

Rozdział Wyniki przedstawia w poprawny sposób uzyskane wyniki, odpowiednio je ilustrując. Rozdział ten jest przejrzysty i logicznie skonstruowany, zastosowano wszystkie wymagane kontrole i dokładnie je opisano. Wyniki czyta się dobrze, jednak odbiór tekstu byłby jeszcze lepszy, gdyby kolejne podrozdziały rozpoczynały się od krótkiego wprowadzenia uzasadniającego przeprowadzenie kolejnych eksperymentów a kończyły zestawieniem wniosków wyciągniętych z uzyskanych wyników. Doktorantka przedstawia analizy wzrostu, tworzenia biofilmu oraz ruchliwości badanego szczepu w porównaniu z kontrolą. Przeprowadzone analizy wskazują, że potrójna mutacja wpływa na ruchliwość zmutowanego szczepu. Następnie opisane zostały analizy transkrypcyjne oraz analizy translacji przeprowadzone w 7 punktach czasowych sporulacji. Zaobserwowano, że stosunkowo niewielki wpływ mutacji na transkrypcję i translację, staje się wyraźniejszy pod koniec procesu sporulacji. W związku z powyższym przeprowadzono badania mikroskopowe sporulacji i kiełkowania spor, analizując translację oraz subkomórkową lokalizację rybosomów w czasie tych procesów. Wykorzystano w tym celu barwienia fluorescencyjne oraz znakowane fluorescencyjnie szczepy *B. subtilis*. Badania te udowodniły, że potrójna delecja genów kodujących alternatywne białka rybosomalne wpływa na przebieg procesu kiełkowania prawdopodobnie, zmieniając wrażliwość spor na wysoką temperaturę. Ta interpretacja rodzi pytanie, czy możliwe jest, że alternatywne białka rybosomalne mogą być niezbędne podczas wczesnych etapów kiełkowania także w sporach, które nie były ekspozycjonowane na wysoką

temperaturę. Rozdział Wyniki budzi kilka dodatkowych pytań i wątpliwości. Analizując żel przedstawiający przygotowanie próbek w eksperymencie profilowania rybosomów (str. 136) zastanawiałam się, dlaczego zakres wielkość RNA był stosunkowo duży i czy oczekiwana wielkość fragmentów otrzymanych po trawieniu mMNa₂ nie powinna być mniejsza. Ponadto, w moim odczuciu wskazane byłoby umieszczenie zawartych w Wynikach informacji dotyczących przygotowania bibliotek do sekwencjonowania w rozdziale metody. Kolejne pytanie dotyczące rozdziału Wyniki, to czy przy szacowaniu istotności zmiany poziomu transkrypcji (Tabela 4.10) uwzględniano poziom transkrypcji. Dwukrotna zmiana poziomu może być mało istotna, jeśli poziom transkrypcji jest bardzo niski. Pewne zastrzeżenia budzi też sposób przedstawienia analiz mikroskopowych – biorąc pod uwagę, że analizowano niebieską i zieloną fluorescencję, czytelność obrazów byłaby znacznie większa, gdyby zdjęcia w różnych kanały fluorescencyjne pokazano niezależnie. Ponadto w opisach do rysunków, na których przedstawiono analizy statystyczne (rys. 4.32, 4.29, 4.26, 4.34) należałoby podać liczby analizowanych spor. Dalsze pytania dotyczące tego rozdziału to: czy można się pokusić o znalezienie wspólnych cech transkryptów dla których zaobserwowano zmiany w odcisku rybosomalnym w szczepie pozbawionym alternatywnych białek rybosomalnych. Czy próbowano porównać transkrypty, których translacja ulega zmianie i znaleźć ich cechy wspólne? Czy możliwa jest wizualizacja rybosomów ujawniająca ich heterogenność – np. wyznakowanie niektórych alternatywnych białek rybosomalnych? Chciałabym zaznaczyć, że pytania i uwagi zawarte w recenzji nie wpływają na wysoką ocenę pracy, są one wyrazem ciekawości i chęci przedyskutowania uzyskanych wyników.

Dyskusja stanowi w znacznym stopniu omówienie wyników, ale nie brakuje w niej licznych odniesień do publikacji oraz interpretacji otrzymanych wyników. Doktorantka w dojrzały sposób analizuje fenotyp badanego zmutowanego szczepu w odniesieniu do zaobserwowanych zmian w profilu transkrypcji i translacji wysnuwając ciekawe wnioski. Bardzo cenne są niektóre wyjaśnienia, których zabrakło w wynikach – np. dotyczące możliwości zbadania zmutowanego szczepu w warunkach niedoboru cynku. Z niektórymi interpretacjami jednak nie mogę się zgodzić np. wytłumaczenie skutków zmiany poziomu *gyrA* poprzez zahamowanie inicjację replikacji – czy Doktorantka mogłaby rozważyć inne skutki zmiany poziomu ekspresji genu *gyrA*? Na zakończenie pracy Autorka zestawiła najważniejsze wnioski wypływające z przeprowadzonych badań. Praca zawiera też listę skrótów oraz spis tabel i rysunków. Uwagę zwraca bardzo obszerne, a nawet nadmiernie szczegółowe streszczenie. Obfituje ono w szczegóły dotyczące wyników ale trochę mniej klarowne jest

uzasadnienie celu pracy i brakuje syntetycznego podsumowania wypływających z pracy wniosków. Warto zaznaczyć, że Doktorantka w pracy odwołuje się do około 400 pozycji literaturowych, co stanowi imponującą bibliografię i demonstuje dokładne zgłębienie tematu pracy.

Praca jest starannie przygotowana pod względem edytorskim, dostrzegłam tylko pojedyncze błędy edytorskie (rys. 1.36 – błąd w opisie, str. 61 - błąd w tytule podrozdziału, powtórzenie akapitu na stronie 106). Można też znaleźć językowe potknięcia, najczęściej są to kalki językowe (np. str. 20 – „regulacja w górę”, str. 44 – „skośnie motywy”, str. 105 „gen na główne białko”, notorycznie jest używane nieprawidłowe określenie – „ekspresja białka”, pojawia się też „transkrypcja białka”). Praca jest bardzo bogato ilustrowana, a rysunki są czytelne, prawidłowo opisane i dobrze zacytowane.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Natalii Kopik wnosi istotny wkład w poznanie roli alternatywnych białek rybosomalnych i przyczynia się do poszerzenia wiedzy na temat wyspecjalizowanych rybosomów. Bardzo ważnym i cennym aspektem pracy jest umiejętne połączenie różnorodnych technik badawczych, które pozwoliły Doktorantce na uzyskanie ciekawych wyników. Docenić należy dokładne zapoznanie z literaturą naukową w obszarze pracy doktorskiej. **Uważam zatem, że rozprawa doktorska mgr Natalii Kopik stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i jasno wskazuje, że Doktorantka nabył wiedzę teoretyczną w tematyce rozprawy oraz umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Natalii Kopik spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia doktora, określone w artykuale 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Natalii Kopik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.**

