

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań, 13.02.2024 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kopik pt.:**  
**„Wyspecjalizowane rybosomy u sporulującej laseczki siennej *Bacillus subtilis*”**

**Tematyka i cele rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr Natalii Kopik powstała w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Agata Starosta. Praca ta doskonale wpisuje się w tematykę badawczą prowadzoną przez Panią Promotor, która ma znaczące osiągnięcia w badaniach procesu translacji w różnych aspektach i organizmach.

Podjęta tematyka badawcza dotyczy regulacji procesu translacji przez wyspecjalizowane rybosomy powstające w *Bacillus subtilis* podczas sporulacji. Chociaż od dawna znamy koncepcję zarówno wyspecjalizowanych jak i heterogenicznych pod względem składu rybosomów, nadal jesteśmy jeszcze daleko od zrozumienia molekularnych detali tego procesu. Piszę o tym aby podkreślić, że tematyka wybrana przez Doktorantkę i Jej Promotor jest w pełni oryginalna, a zaplanowane i wykonane przez mgr Natalię Kopik doświadczenia odpowiadają na ważne biologiczne pytania.

**Ocena formalna rozprawy**

Rozprawa doktorska stanowi obszerne, liczące 257 stron opracowanie. Układ pracy jest przejrzysty, a lekturę ułatwiają ryciny. Pod względem formalnym rozprawa jest przedstawiona poprawnie i nie mam poważniejszych zastrzeżeń do jej zawartości.

Cała praca jest napisana bardzo dobrze, ładnym naukowym językiem, choć w wielu miejscach pojawiły się niefortunne określenia, np. „regulacja w górę” zamiast „podwyższenie ekspresji”, „odwrócona” zamiast „odwrotna” transkrypcja, „primer” zamiast „starter”, „liganda” zamiast „ligandu, czy „elektroforeza na 15% żelu” zamiast „w 15% żelu”. W wielu miejscach przy opisywaniu wyników porównawczych (również w rozdziale VI. Podsumowanie i wnioski) brakuje zdefiniowania do czego konkretna cecha była porównana, np. „Hodowla szczepu BGSC cechowała się znacząco słabiej rozwiniętym biofilmem (...) – w porównaniu do czego?, lub „(...) szczep 3KO wykazał znacząco mniejszą mobilność (...)” – niż co? W pracy dyplomowej rangi pracy doktorskiej nie powinny się one znaleźć, choć rozumiem, że ze względu na obszerność pracy mogły pozostać niezauważone przez Autorkę.

Streszczenie jest bardzo dobrze napisane i podsumowuje obszerne wyniki pracy w sposób zwięzły, ale jednocześnie nie pomija żadnej ważnej obserwacji. Brakuje mi jednak w tym miejscu krótkiego odniesienia do tytułu pracy, czyli do wyspecjalizowanych rybosomów. **Bardzo proszę, aby podczas obrony rozprawy doktorskiej przedstawiła Pani w kilku zdaniach podsumowujących związek między Pani wynikami a specjalizacją rybosomów.**

W kolejnym rozdziale czytelnik zostaje wprowadzony w szczegółowe zagadnienia dotyczące *Bacillus subtilis*, procesu sporulacji i specjalizacji rybosomów. Ten rozdział również czyta się bardzo przyjemnie, choć nie mogłam oprzeć się wrażeniu, że w niektórych miejscach jest zbyt wnikliwy (jest to sprawa subiektywna, ale wydaje mi się, że nie ma konieczności opisywania np. schematu budowy kinaz histydynowych). Rozdział jest dobrze zilustrowany rycinami, choć podpisy nie wszystkich z nich są wyczerpujące, np. w przypadku Ryc. 1.14, 1.15, czy 1.19.

Następnie Doktorantka podała cel pracy, definiując go w pierwszej kolejności jako „scharakteryzowanie potrójnego mutanta delecyjnego”, a w drugiej kolejności – ujawnienie roli, jaką pełnią wyspecjalizowane rybosomy podczas sporulacji. Cel pracy – czyli pierwsze zdanie drugiego akapitu w rozdziale „Hipoteza i cel pracy” został przedstawiony jednak bardzo niefortunnie. Celem nie może być scharakteryzowanie bakterii w celu „przeanalizowania roli”. Podobnie „Cele szczegółowe” – celem Pani pracy nie była „analiza różnic fenotypowych”, ani tym bardziej „badanie krzywej wzrostu” (to jest metoda, a nie cel). Celem szczegółowym było raczej wskazanie potencjalnych różnic fenotypowych między szczepami, w tym tempa wzrostu, itp. **Bardzo proszę zatem podczas obrony pracy doktorskiej o przedstawienie nowo sformułowanego głównego celu pracy oraz celów szczegółowych.** Ponadto, rozdział, pomimo swej nazwy „Hipoteza i cel pracy” nie wskazuje na hipotezę Pani pracy doktorskiej. Przedstawia natomiast hipotezę istnienia wyspecjalizowanych rybosomów. **Proszę zatem podczas obrony pracy doktorskiej o przedstawienie hipotez(y) Pani rozprawy.**

Kolejny rozdział pracy omawia zastosowane metody i tutaj mam **dwie uwagi, do których proszę o komentarz podczas obrony rozprawy:**

- Rozdział 6.3 – Oznaczenie ilości tworzono biofilmu – jaka jest argumentacja zastosowania różnego czasu hodowli bakterii: 3 dni w probówkach szklanych vs 5 dni w probówkach plastikowych?
- Biblioteki do sekwencjonowań przygotowane zostały w dwóch laboratoriach (czyli były to powtórzenia zarówno biologiczne jak i techniczne). Podobnie, sekwencjonowania wykonano w różnych laboratoriach. Czy podczas planowania eksperymentu nie obawiali się Państwo wariacji technicznych?

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Rozprawa doktorska Pani Natalii Kopik jest ciekawą i skuteczną próbą wglądu w specjalizację rybosomów podczas sporulacji *B. subtilis*. Doktorantka zaplanowała swoją rozprawę w sposób bardzo staranny, tutaj widać dużą wiedzę, rzetelność i skrupulatność przy planowaniu eksperymentów: zawsze są kontrole, wstępne testy, potwierdzenie nietypowych obserwacji. Cele, choć niefortunnie nakreślone przez

Doktorantkę, odpowiadają wynikom uzyskanym w pracy. Praca stanowi obszerny opis zmian podczas procesu sporulacji i niewątpliwie dostarcza informacji, które mogą zostać wykorzystane dla dalszych działań dotyczących molekularnych, komórkowych i fizjologicznych aspektów występowania wyspecjalizowanych rybosomów.

Realizacja badań wymagała od Doktorantki wykonania wielu eksperymentów, rozpoczynając od tych najbardziej podstawowych, wymaganych do scharakteryzowania szczepów *B. subtilis*. Pani Magister wyznaczyła krzywe wzrostu bakterii w zróżnicowanych pod względem składu pożywkach, zbadała wpływ wielu związków chemicznych na ich wzrost, oznaczyła zdolność tworzenia biofilmu i mobilność szczepów. Ta część wyników jest dobrze i przejrzysto zaprezentowana w postaci tabel i rycin. Pomimo, że wyników jest naprawdę sporo, graficzna prezentacja pomaga obserwacji różnic.

Podczas analizy tekstu nasunęły mi się **cztery pytania, na które poproszę o odpowiedź podczas obrony rozprawy:**

- Czy obserwowane różnice w testach dyfuzji dyskowej dla szczepu WT i 3KO były istotne statystycznie?
- Czym wytłumaczyłaby Pani zwiększenie tworzenia biofilmu w pożywce LBGM?
- Dlaczego na rycinach 4.5 – 4.9 przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, zamiast zdjęć wszystkich prób?
- Rozumiem, że Doktorantka uczestniczyła w konstrukcji bibliotek do sekwencjonowania z jednego powtórzenia biologicznego i stąd przedstawione w Tabeli 4.4 wyniki pomiarów zawartości całkowitego RNA. Nasuwa mi się jednak pytanie, w ilu powtórzeniach wykonano izolację RNA z poszczególnych próbek (np. do wcześniejszych testów, kontrolnego sprawdzenia wydajności metody, itp.). Jeśli wyłącznie w jednym (tym, którego wyniki przedstawione zostały w tabeli 4.4), to stwierdzenie „(...) ilość RNA spadała w miarę postępu sporulacji” może być nieuzasadnione i wynikać np. z technicznych wariacji podczas izolacji próbek.

Z kolei etap pracy dotyczący wyszukiwania wyspecjalizowanych rybosomów Doktorantka rozpoczęła od przygotowania bibliotek RNA-seq i RIBO-seq. Analiza danych z wysokoprzepustowych sekwencjonowań wyłoniła geny, których ekspresja, jak i translacja jest zmieniona, zwłaszcza w ostatnim etapie sporulacji. Obserwacje opisane są w trzech podrozdziałach, dotyczących zmian w transkrypcji i translacji czynników transkrypcyjnych, białek związanych z procesem sporulacji i białek rybosomalnych. Następnie przedstawiono ogólne różnice w transkrypcji i translacji genów między szczepami. Takie zaprezentowanie wyników, tj. najpierw przedstawienie konkretnych kategorii funkcjonalnych, a później całości wyników jest odmienne od typowego toku prezentacji wyników sekwencjonowania, ale w tej pracy bardzo logiczne, stawiające na pierwszym miejscu ważne dla sporulacji geny. Bardzo mi się podoba takie podejście. Do tego rozdziału mam dwie uwagi: w rozdziale 2.4 Analiza RNA-seq i RIBO-seq czynników transkrypcyjnych brakuje wyników z RIBO-seq, a w tabeli 4.10 powinno być „Krotność różnicy w transkrypcji”.

**W tym rozdziale brakuje mi kilku informacji i proszę Doktorantkę o komentarz do następujących pytań i uwag:**

- Czy wykryto różnice w translacji w punktach czasowych T0-T6?
- Dla ilu spośród różnicujących na poziomie transkrypcji genów zmiany wykryto również na poziomie translacji. Które to były geny?
- Niewątpliwie, niniejszą pracę wzbogaciłyby badania podjęte w celu klasyfikacji różnicujących genów według funkcji produktu genu, procesu biologicznego, czy też lokalizacji komórkowej produktu genu (Gene Ontology terms). Czy takie analizy zostały podjęte?

Trzecia część wyników dotyczy obserwacji poczynionych podczas sporulacji z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Doktorantka zwiualizowała zarówno chromosomy jak i rybosomy, dzięki czemu mogła obserwować postęp sporulacji oraz zlokalizować proces translacji. Wyniki są bardzo dobrze udokumentowane fotograficznie i umożliwiają obserwacje różnic dynamiki rozwoju sporulacji i procesów z nią związanych. To jest zdecydowanie duży wkład w istniejącą wiedzę.

Wszystkie przedstawione powyżej komentarze w najmniejszym stopniu nie mają na celu umniejszania wartości merytorycznej pracy. Moje uwagi mają raczej charakter polemiczny i są podyktowane chęcią dyskusji. Naukowa wartość niniejszej rozprawy pozostaje wysoka i bardzo cenię tę część, w której Doktorantka opisuje uzyskane wyniki i dyskusję nad nimi. Zarówno konstrukcja, jak i jakość wyników i dyskusji jest bardzo trafna. Autorka analizuje każdy wynik z różnych perspektyw. Wnioski sformułowane są poprawnie, a uzyskane wyniki stanowią wyczerpujący materiał do dalszych badań, których zwieńczeniem będzie wartościowa publikacja.

### **Wnioski końcowe**

Rozprawę doktorską mgr Natalii Kopik oceniam bardzo dobrze, uważam za wartościową naukowo i przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Autorka przedstawiła w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe, które dostarczają nowej wiedzy na temat powiązania procesu sporulacji z możliwą specjalizacją rybosomów. Oceniana praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kopik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Kamilla Grzywacz*

dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN