



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, dnia 6.03.2024

Dr hab. Łukasz Łaczmanski

Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Natalii Kopik „Wyspecjalizowane rybosomy u sporulującej laseczki siennej *Bacillus subtilis*” wykonanej pod opieką dr hab. Agaty Starosty.**

Laseczka sienna (*Bacillus subtilis*) jest dobrze zbadanym organizmem modelowym często wykorzystywanym w procesach medycznych, przemyśle farmaceutycznym, rolniczym czy przemysłowym. Jest jednym z najczęstszych mikroorganizmów, który wykorzystuje się do produkcji enzymów, białek heterologicznych, dodatków do żywności, leków, witamin czy antybiotyków. Co więcej gatunki z rodzaju laseczek mogą być bakteriami tzw. podwójnego zastosowania, tzn. z jednej strony być wykorzystywane w przemyśle, a z drugiej jako element broni biologicznej czy w atakach bioterrorystycznych. Obecnie np. *Bacillus anthracis* bywa powszechnie używany do symulacji potencjalnego ataku bioterrorystycznego. Natomiast w trakcie zimnej wojny był jednym z ważniejszych patogenów broni biologicznej.

W obecny trend zainteresowania laseczkami wpisuje się praca doktorska Pani Natalii Kopik. Jej podstawowym celem jest badanie procesu sporulacji w kontekście roli jaką mogą odgrywać w nim wyspecjalizowane rybosomy.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Kopik liczy 257 stron, zawiera 20 tabel oraz 107 rycin. Została podzielona na klasyczne części charakterystyczne dla typowych rozpraw naukowych, tj. Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Bibliografia.



W pierwszej części rozprawy zajmującej 94 strony doktorantka przedstawiła podstawy teoretyczne opisujące:

1. Właściwości oraz zastosowanie *Bacillus subtilis*.
2. Przebieg procesu sporulacji.
3. Germinację spor.
4. Hipotezę wyspecjalizowanych rybosomów.
5. Wybrane paralogi białek rybosomalnych.

W ocenie recenzenta ta część świadczy o nieprzeciętnej wiedzy Doktorantki na opisywany temat. Jednakże została nadmiernie rozbudowana. Tym bardziej, że wiele informacji ze wstępu zostało powielonych w Dyskusji, szczególnie te dotyczące roli poszczególnych produktów genów w badanych procesach. W dysertacji naukowej niezbędne jest abyśmy potrafili wybrać te aspekty, które są konieczne dla logicznego przedstawienia problemu. Wstęp rozprawy doktorskiej powinien nas wprowadzić w jej tematykę i ułatwić sformułowanie problemu badawczego.

W kolejnej części dysertacji Doktorantka przedstawiła logiczną hipotezę badawczą. Miała ona zostać udowodniona poprzez określenie głównego oraz trzech szczegółowych celów. W następnej kolejności Doktorantka obszernie opisała wykorzystywane materiały i metody. Zostały one pokazane w sposób przejrzysty co świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzonych badań. Jednak lektura tego rozdziału skłania recenzenta do postawienia kilku pytań:

1. RNA-Seq oraz profilowanie rybosomów wykonano w dwóch biologicznych powtórzeniach. Nasuwa się pytanie dlaczego nie w minimum trzech co jest dobrą praktyką przy tego typu oznaczeniach? Dlaczego oznaczenia zostały wykonane w dwóch niezależnych ośrodkach, takie podejście wygenerowało dodatkowo potrzebę walidacji uzyskanych danych?
2. Dlaczego do deplekcji rRNA użyto zestawu dedykowanego ogólnie do bakterii, a nie zestawu typu „custom” do deplekcji rRNA tego konkretnego gatunku? Ponieważ genom *Bacillus subtilis* jest dobrze poznany to optymalizacja takiej metody nie stanowiłaby problemu (wykonuje to np. firma Roche). Przeprowadzona podczas



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

pracy badawczej deplecja charakteryzowała się dość niską skutecznością (wg danych pokazanych w wynikach usunięto tylko ok 50% rRNA). Zastosowanie deplecji specyficznej gatunkowo prawdopodobnie znacznie polepszyłyby wydajność tego procesu.

3. Prosiłbym również o informację dlaczego i na jakiej podstawie zmodyfikowano protokół RNA-Seq? Czy Doktorantka kierowała się jakimiś wytycznymi z innych artykułów badawczych? Wyjaśnienie tej kwestii jest szczególnie istotne gdyż zdjęcia elektroforezy, które zostały zaprezentowane w Wynikach świadczą o nie do końca optymalnym procesie tworzenia bibliotek RNA-Seq (duży procent wysoko i niskocząsteczkowych fragmentów).
4. Dlaczego zastosowano procedurę wycinania żelu i oczyszczania bibliotek o bardzo konkretnej wielkości? W ten sposób znacznie obniżono wydajność uzyskania bibliotek. Może to być przyczyną niskiej wydajności mapowania odczytów do sekwencji referencyjnej (8-16% dla RNA-Seq i 7-22% dla RIBO-Seq)

Doktorantka zaplanowała zastosowanie testów statystycznych adekwatnych do otrzymanych wyników i wyciągnęła odpowiednie wnioski. Również poprawnie została przeprowadzona analiza bioinformatyczna. Z ciekawości recenzenta wynika pytanie dlaczego zdecydowano się użyć do mapowania odczytów do referencji programu STAR zamiast automatycznie nasuwającego się HISAT2 lub ewentualnie bowtie2?

Otrzymane wyniki zostały przedstawione w 15 tabelach oraz na 35 rycinach opisanych na 50 stronach. Wyniki zostało pokazane w sposób czytelny i nie wymagający dodatkowego komentarza.

W Dyskusji Doktorantka odniosła się do uzyskanych wyników oraz skonfrontowała je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Zrobiła to w sposób zorganizowany i czytelny. Co więcej na podstawie swoich danych oraz doniesień literaturowych przedstawiła koncepcje mechanizmów tłumaczących uzyskane wyniki. Zdaniem recenzenta jest to niewątpliwie najlepiej napisany rozdział dysertacji. Niestety w końcowej części zabrakło ustosunkowania się do słabszych aspektów przeprowadzonych eksperymentów (tzw. "limitation"). Taki fragment w dyskusji świadczyłby o krytycznym



HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Centre of Excellence: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

---

podejściu do uzyskanych wyników oraz o dużej dojrzałości naukowej doktoranta. Dlatego szkoda, że tego zabrakło.

Dyskusja kończy się krótkim podsumowaniem, które w dużym stopniu ułatwia dobre zrozumienie prowadzonych badań. Opisane wyniki pozwoliły Doktorantce na sformułowanie 8 konkretnych wniosków.

W rozprawie doktorskiej mgr Natalia Kopik zacytowała 520 pozycji literaturowych, z których niestety tylko 91 (17.5%) stanowiły opublikowane w ostatnich 5 latach. Co więcej sporo jest pozycji, które ukazały się kilkanaście lub kilkadziesiąt lat temu. Zdaniem recenzenta należałoby okroić objętość dysertacji pomijając dawno opisane mechanizmy i skupić się na omówieniu jedynie najnowszych doniesień dotyczących realizowanego tematu.

Pani mgr Natalia Kopik jest współautorem dwóch doniesień konferencyjnych międzynarodowych oraz dwóch krajowych (jedno z wyróżnieniem). Jest również współautorem dwóch publikacji naukowych w renomowanych czasopismach z Listy Filadelfijskiej. Prowadziła szereg aktywności związanych z poszerzaniem swej wiedzy (udział w szkoleniach i kursach) jak również innych projektach badawczych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. Zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kopik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Łukasz Łaczmanski