



## 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 24.03.2018

Prof. dr hab. Dagmara Jakimowicz  
Z-d Mikrobiologii Molekularnej  
Wydział Biotechnologii  
Uniwersytet Wrocławski

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Greli, pod tytułem „Warianty receptora GerA w przetrwalnikach różnych szczepów laboratoryjnych *Bacillus subtilis*”**

Recenzowana praca została wykonana w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej pod opieką prof. dr hab. Michała Obuchowskiego oraz dr Adama Iwanickiego, w zespole od wielu lat zajmującym się między innymi procesami związanymi z tworzeniem i kiełkowanie przetrwalników *Bacillus subtilis*. Praca stanowi kontynuację badań prowadzonych w Zakładzie i dotyczy receptorów kiełkowania – czyli białek uruchamiających kiełkowanie przetrwalników wspomnianych powyżej bakterii. Temat ten jest ciekawy nie tylko z poznawczego punktu widzenia ale także, ze względu na praktyczne, w tym kliniczne znaczenie kiełkowania przetrwalników bakterii chorobotwórczych. Zrozumienie mechanizmów regulujących ten proces może ułatwić jego kontrolę i zapobieganie temu zjawisku w niepożądanych sytuacjach, na przykład podczas przechowywania produktów spożywczych.

Doktorantka skupiła się na receptorzcie kiełkowania GerA i jako cel postawiła sobie wyjaśnienie wpływu wymiany poszczególnych reszt aminokwasowych na jego aktywność. Część badanych mutacji (Ala299Thr oraz Ser302Pro) zidentyfikowano dzięki analizie sekwencji wybranych szczepów różniących się fenotypem kiełkowania. Kolejne badane mutacje to modyfikacja reszty aminokwasowej potencjalnie zaangażowanej w wiązanie L-alaniny. Aby zbadać rolę wybranych reszt aminokwasowych dla funkcji receptora GerA Doktorantka przygotowała obszerny zestaw zmodyfikowanych szczepów *B. subtilis* z różnymi wariantami genu *gerAA*, w tym szczepów zawierających dwie kopie genu *gerAA* i

takich w których jedna z dwóch kopii genu ulegała nadekspresji. Kiełkowanie przygotowanych szczepów w obecność L-Ala badano mierząc spektrofotometrycznie odsetek kiełkujących przetrwalników oraz mierząc ilość uwalnianego DPA. Badania te uzupełnione zostały analizą modelu struktury białka GerAA, co ułatwiło interpretację uzyskanych wyników. **Najważniejsze osiągnięcia pracy** to potwierdzenie wpływu punktowych mutacji na aktywność receptora kiełkowania GerA i poznanie wpływu obecności zmutowanych alleli genu *gerAA* na fenotyp kiełkowania przetrwalników, także w różnych tłach genetycznych i przy różnych poziomach funkcjonalnego i zmutowanego receptora GerA. Otrzymane wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu działania receptora, wskazując na rolę Ala299 w stabilizacji kompleksu receptora.

Praca doktorska mgr Anny Greli ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Wstęp pracy stanowi ciekawe wprowadzenie do tematyki pracy. Zwiera on informacje dotyczące modelowego organizmu używanego w pracy – *B. subtilis*, przedstawiając cykl życiowy tych bakterii oraz szeroko opisując kolejne fazy tworzenia i kiełkowania przetrwalników. Doktorantka wspomniała o metodach badań kiełkowania przetrwalników i czynnikach wpływających na tempo kiełkowania spor. Dużo uwagi poświęcono także praktycznemu znaczeniu przetrwalników, a szczególnie konsekwencjom ich kiełkowania powodującego skażenie żywności. Rozdział Materiały obejmuje zestawienie używanych plazmidów i szczepów bakteryjnych a także dokładny, wręcz wzorowy opis używanych starterów. Zgodnie z konwencją w rozdziale tym wymienione są także stosowane antybiotyki, enzymy, bufony i inne roztwory a także gotowe zestawy. Niezgodne z obowiązującą konwencją jest natomiast umieszczanie tytułów tabel pod, zamiast nad tabelami. Rozdział Metody zawiera poprawny i staranny opis stosowanych metod. Jedyne procedury przygotowania przetrwalników opisana na str. 52 wzbudziła moje wątpliwości - niejasne było dla mnie sformułowanie „Przez okres 10 dni, przetrwalniki wirowano i płukano”. Można też pokusić się o dyskusję, czy poprawne jest określenie wektora używanego do delecji genu za pomocą rekombinacji homologicznej plazmidem integracyjnym. Rozdział „Wyniki i dyskusja” łącząc przedstawienie uzyskanych wyników wraz z ich omówieniem prowadzi czytelnika przez bardzo staranny i logiczny opis kolejno prowadzonych eksperymentów. Na uznanie zasługuje klarowność opisu. Zasadność kolejno przeprowadzanych eksperymentów jest wyjaśniana na początku każdego podrozdziału, Doktorantka nakreśliła też hipotezy i oczekiwane na ich podstawie wyniki, co znacznie ułatwia śledzenie interpretacji uzyskanych danych. Lekturę rozdziału Wyniki wspomaga także porównanie badanych szczepów w podgrupach, co umożliwia bardziej klarowne pokazanie różnic pomiędzy nimi. Graficzna prezentacja



wyników jest również bardzo staranna i czytelna, a opisy rysunków nie budzą zastrzeżeń. Można zastanowić się jedynie, czy nie byłoby możliwe przedstawienie uzyskanych wyników w szerszym kontekście dostępnych danych literaturowych. Praca zakończona jest podsumowaniem, które w 15 punktach zestawia najważniejsze wnioski pracy. Ostatni rozdział pracy stanowi zestawienie bibliografii wykorzystanych w pracy, a fakt, że jest ich blisko 170 świadczy o dobrym rozeznaniu literaturowym Doktorantki.

Podsumowując, chcę podkreślić, że rozprawa napisana poprawnym językiem naukowym. Praktycznie nie występują żargonowe czy inne niepoprawne sformułowania, odnotowano jedynie drobne błędy interpunkcyjne. Ponadto, jak wspomniano, rozprawa jest bardzo starannie opracowana i klarowna, co świadczy o tym, że mgr Anna Grela dołożyła wszelkich starań, aby przedstawić swoje Wyniki jak najbardziej czytelnie i zrozumiale.

Lektura „Wyników i dyskusji” nasunęła mi jednak kilka pytań, które mogą stanowić podstawę do dalszej dyskusji w trakcie publicznej obrony:

- Nie jest dla mnie całkiem jasne, dlaczego obecność mutacji w badanym genie potwierdzano za pomocą qPCR – czy inne metody, może łatwiejsze i nie wymagające takiej optymalizacji nie nadawałby się do tego celu?
- Ciekawe wydaje mi się wpływ mutacji w receptorze GerA na kiełkowanie pod wpływem innych induktorów kiełkowania niż L-Ala. Doktorantka nie poświęciła w pracy zbyt wiele uwagi temu zagadnieniu, ale jednak zastanawiające jest, czy wiadomo coś na temat mechanizmu, który mogłoby wyjaśnić obserwowane zjawisko.
- Doktorantka używała szczepów w których gen *gerAA* umieszczony był pod kontrolą silnego promotora *sspB* umożliwiającego nadprodukcję białka. Czy próbowano potwierdzić poziom nadprodukowanego białka?
- Czy rozważano możliwość, że niektóre z wprowadzanych mutacji wpływając na strukturę białka GerAA mogłyby też wpłynąć na jego poziom i/lub lokalizację lub też oddziaływanie z innymi elementami kompleksu receptora. Czy próbowano zweryfikować taki efekt mutacji, a jeśli nie, czy Doktorantka mogłaby zaproponować metody sprawdzenia takiego wpływu mutacji?

Powyższe pytania nie mają wpływu na moją w pełni pozytywną ocenę recenzowanej pracy. Wysoko oceniam przemyślany sposób prowadzenia badań i ich bardzo staranny klarowny opis.

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym a dotychczasowe osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej uzasadniają nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. W związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Greli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Dalimberta*