



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań
tel. +48 61 846 6024
e-mail: marcin.schmidt@up.poznan.pl



WYDZIAŁ NAUK O
ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Poznań, 15 lipca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Hubisz
pt. Analiza funkcjonalna receptora GerA w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*

Opracowanie niniejszej recenzji zostało wykonane zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o powołaniu mnie na Recenzenta w przewodzie doktorskim Pani mgr Marty Hubisz, ubiegającej się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska została napisana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Michała Obuchowskiego w Katedrze Biotechnologii Medycznej MWB UG i GUM z udziałem promotora pomocniczego w osobie Pana dr hab. Adama Iwanickiego.

Niezmiernie istotnymi dla rozwoju nauki są niektóre organizmy, które często z bardzo pragmatycznych uwarunkowań stają się modelowymi. Do tej grupy należy niewątpliwie zaliczyć *Bacillus subtilis*. Spośród gram-dodatnich bakterii wyróżnia się ona zdolnością do tworzenia przetrwalników, która stanowi bardzo ciekawą cechę. Wszelkie aspekty biologii tych struktur przyniosły i ciągle dostarczają wiedzy na temat regulacji ekspresji informacji genetycznej, tworzenia złożonych układów makromolekularnych, a przede wszystkim możliwości długotrwałego przetrwania w anabiozie. Poznanie funkcjonowania procesów z nią związanych dostarczy dużo wiedzy z zakresu biologii molekularnej, która niewątpliwie zostanie wykorzystana w praktyce. Proces formowania i kiełkowania przetrwalników jest, co prawda, badany od wielu lat, aczkolwiek ciągle skrywa całe mnóstwo tajemnic. Dlatego też należy uznać wybór tej tematyki jako wysoce uzasadniony.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Hubisz, która stanowi podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie nauki biologiczne, ma charakter monografii stanowiącej oryginalne osiągnięcie naukowe. Ma ona postać maszynopisu w układzie typowym dla tego typu opracowań z podziałem na wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję oraz materiały i metody. Prócz tego na początku zamieszczono streszczenia w językach polskim i angielskim, zaś na końcu bibliografię i załączniki.

Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona bardzo ciekawym wstępem wprowadzającym czytelnika we wszystkie istotne aspekty odnoszące się do przeprowadzonych badań. Został on opracowany, w przeważającej większości, na podstawie najnowszej literatury, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość zakresu tematycznego prowadzonych przez Autorkę badań i odpowiednie przygotowanie do pracy badawczej. Na szczególną uwagę zasługuje język wypowiedzi wskazujący na bardzo duże zainteresowanie Dyplomantki tą tematyką i Jej predyspozycje dydaktyczne.

Na podstawie danych literaturowych Doktorantka sformułowała bardzo ogólny cel główny dotyczący zgłębienia biologii receptora GerA, który doprecyzowała w postaci trzech celów szczegółowych. Poszczególne, opisywane w rozdziale nr 3 „Wyniki”, uzyskane przez

Panią mgr Martę Hubisz rezultaty badań poprzedzone są każdorazowo wstępem teoretycznym wprowadzającym czytelnika w kontekst obecnego stanu wiedzy wraz z krytycznym ich komentarzem uzasadniającym podjęte działania. Taki sposób interakcji z czytelnikiem ma swoje niewątpliwe zalety. Aczkolwiek, ponieważ podrozdział nr 3.1 nie zawiera opisu żadnych oryginalnych wyników uzyskanych przez Dyplomantkę uważam, że powinien w ramach struktury manuskryptu być połączony z podrozdziałem 3.2. W ramach przygotowań do właściwego eksperymentu Doktorantka przygotowała konstrukt genetyczny zawierający sekwencję operonu *gerA* z sekwencjami flankującymi oryginalne locus gdzie poszczególne sekwencje kodujące zostały połączone ze znacznikami (*gerAA*-FLAG, *gerAB*-HA, *gerAC*-cMyc; plazmid pEZBM05). Przygotowanie takiego konstrukt genetycznego świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Panią mgr Hubisz warsztatu inżynierii genetycznej, nie tylko w zakresie czynności laboratoryjnych, ale przede wszystkim analizy sekwencji, znajomości sygnałów regulatorowych, doboru endonukleaz restrykcyjnych i projektowania starterów. Opracowanie samej koncepcji takiego konstrukt genetycznego wymaga dużej wiedzy. Szkoda, że Dyplomantka nie umieściła w pracy projektu tego zmodyfikowanego *locus* (wraz z lokalizacją usuniętych i wprowadzonych motywów: RBS, kodonów start/stop, sygnałów terminacji transkrypcji, miejsc fuzji sekwencji, itp). Przygotowany konstrukt w wektorze plazmidowym pozwolił uzyskać genetycznie modyfikowany szczep BZBM01 dla celów dalszych badań. Ważnym pytaniem, na które nie znalazłem odpowiedzi w tekście pracy jest kwestia ile rekombinantów zregenerowano po transformacji i czy powstała modyfikacja genetyczna została zweryfikowana poprzez sekwencjonowanie? Czy w procesie ligacji nie zaszły jakieś nieoczekiwane zmiany w sekwencji mogące zaburzyć szeroko pojęty proces ekspresji tej informacji genetycznej. Przetrwalniki zmodyfikowanego szczepu BZBM01 nie wykazywały zdolności kiełkowania co pozwala sądzić, że wprowadzone w strukturę białek receptora GerA znaczniki zaburzą jego funkcjonowanie. Ten etap badań pozostawia mały niedosyt, wynikający z faktu, że Doktorantka nie podjęła próby zebrania innych informacji wykorzystując uzyskany szczep. Jedynie włączyła go do ostatniego cyklu badań dotyczących analizy poziomu transkrypcji sekwencji kodujących białka receptora metodą qPCR.

Kolejnym zadaniem badawczym, którego rozwiązania podjęła się Pani mgr Marta Hubisz było wyjaśnienie znaczenia konserwowanego motywu VPFP (323-326) w białku A receptorów GerA, GerB i GerK. Motyw PFP (324-326) białka GerAA był już wcześniej badany (Mongkolthanasakul et al., 2011). Dyplomantka jednak zdecydowała się na ponowną analizę tej pozycji w kontekście krytycznej analizy literatury. Jej wybór potwierdzony został uzyskanym wynikiem symulacji wpływu pojedynczych substytucji aminokwasowych na funkcję białka (serwis SNAP2). Dlaczego (a może czy nadal) uważa ten motyw (występujący w domenie klasyfikowanej jako transbłonowa, UniProt) za ciekawszy od także zakonserwowanego motywu REAG (342-345; Rycina 9 i S1) o równie wysoce prawdopodobnym znaczeniu (SNAP2)? Aby zweryfikować hipotezę o wpływie rozmiaru reszty aminokwasowej wprowadzonej w pozycję 324 białka A skonstruowała cztery mutanty (BMHP324A, BMHP324S, BMHP324G i BMHP324F). Już na etapie preparatyki Dyplomantka dostrzegła różnice fenotypowe wynikające z wprowadzonych mutacji, które dotyczyły heterogenności populacji przetrwalników. Jest to kolejny ciekawy aspekt badań pozostawiony bez kontynuacji, a w mojej ocenie warty lepszego poznania choćby w zakresie ilościowej analizy obrazów mikroskopowych. Idealnym rozwiązaniem byłoby jednak podjęcie się rozdzielenia na frakcje (sortowanie) poszczególnych morfotypów przetrwalników oraz sprawdzenie czy ich proporcje utrzymują się w czasie przechowywania.

Następnie Doktorantka analizowała wydajność kiełkowania poszczególnych mutantów względem szczepu referencyjnego (BAG17). W opisie wyników pojawia się pewna nieścisłość. Przetrwalniki z mutacją P324A kiełkowały, w Jej ocenie, najwydajniej w

obecności 10mM L-alaniny. W następnym zdaniu zawarta jest informacja, że pozostałe mutanty kiełkowały z porównywalną wydajnością do szczepu referencyjnego. Przy czym w kolejnym, z tej grupy wykluczone zostały jednak mutanty P324S i P324G. Sądzę, że analiza statystyczna lub chociaż uwzględnienie na wykresie słupków błędów wzmocniłoby tą subiektywną interpretację wartości pomiarowych. Podobne postępowanie proponowałbym w odniesieniu do kolejnych prezentowanych wyników (Ryciny 15-20). Liczne szczegółowe analizy kiełkowania wykazały, że mutacje P324S i P324G białka A receptora GerA wpływają także na działanie pozostałych receptorów kiełkowania i wydajność kiełkowania niezależnego od receptorów. Za szczególnie ciekawy wynik uważam zaobserwowane różnice w kiełkowania mutantu P324G w obecności L-, D-alaniny i L-waliny oraz P324G w obecności D-alaniny. Na Rycinie 16A szczególnie dobrze widoczne są różnice w kinetyce kiełkowania (uwalniania DPA) porównywanych szczepów. Czy wynikać to może z różnic w kooperatywnym oddziaływaniu z innymi receptorami czy zaobserwowanej heterogenności generowanych przez mutanty przetrwalników (Podrozdział 3.3.4)?

Ostatnim zadaniem badawczym, które zrealizowała Pani mgr Marta Hubisz była analiza porównawcza poziomów transkryptów w wybranych szczepach w trakcie inicjacji sporulacji. W tym celu Doktorantka opracowała i zoptymalizowała metodę multipleks-qPCR, którą można uznać za jedno z najdokładniejszych narzędzi mogących zostać wykorzystane do tego celu. Uzyskane wyniki znormalizowanych poziomów transkryptów *gerAA*, *gerAB* i *gerAC* (względem *sigA*) dla badanych szczepów wykazują duże zróżnicowanie ekspresji zarówno pod względem poziomu jak i profilu czasowego oraz organizacyjnego poszczególnych ORF. Doktorantka szczegółowo opisuje zaobserwowane różnice, wskazuje na kontekst genetyczny, antysensowny transkrypt S1275 oraz zmiany kodonów jako potencjalne przyczyny zróżnicowanego poziomu transkryptów. Przy czym nie zgadzam się z Jej stwierdzeniami: „Biorąc pod uwagę geny operonu *gerA* w wariacie typu dzikiego, poziom ekspresji genów operonu *gerA* w szczepie BAG17 jest najniższy w porównaniu do szczepów PY79 i 168” oraz „Szczep BZBM01 również zawiera geny operonu *gerA* w wariacie typu dzikiego” - kwalifikującymi jako typu dzikiego szczepu: BAG17 (168 Δ *gerA thrC::gerAB-gerAC amyE::gerAA*) i BZBM01 (BAG13 *gerAA-FLAG-gerAB-HA-gerAC-cMyc*). Jednocześnie proszę o przedstawienie podczas obrony pracy szerszej dyskusji odnośnie potencjalnych czynników (biologicznych jak i metodycznych) mogących powodować uzyskanie profilu ekspresji, który „...jest o tyle nieoczekiwany, ponieważ dotychczasowa literatura na temat receptora GerA zakłada równocenną ekspresję genów operonu” (brak cytowania literatury źródłowej; str. 65 manuskryptu).

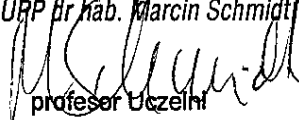
Pani mgr Hubisz w dyskusji przedstawiła ciekawe interpretacje wyników swoich badań i hipotezy dotyczące wpływu wygenerowanych substytucji aminokwasowych na funkcjonowanie receptora GerA. Przy czym nie podzielam Jej uwagi odnośnie potencjalnego wpływu mutacji kompensujących albo promujących nadaktywny fenotyp (str. 69 i 71 manuskryptu). Takie zdarzenia są łatwe do weryfikacji i mogły zostać wykonane w ramach tej pracy. Jednocześnie teorią mutacji tłumaczy defektywny fenotyp szczepu BZBM01. W pracy nie ma wzmianki o weryfikacji sekwencji transgenu ani potwierdzenia jego ekspresji na poziomie białka. Wskazaniem byłoby aby tekst pracy zwięździł podsumowanie zawierające wnioski wysnute z wyników zrealizowanych celów badawczych.

Należy mieć na uwadze, że recenzent dokonuje oceny mając do dyspozycji, z perspektywy czasu, często o wiele szerszy zasób wiedzy niż ten którym operowała Doktorantka. Informacje zdobywane były przez nią z badań własnych i pojawiających się na bieżąco publikacji innych zespołów sukcesywnie na przestrzeni całego czasu wykonywania pracy badawczej – niejednokrotnie kilku lat. Dlatego też niektórych moich uwag nie należy rozpatrywać jako krytyki negatywnej a jedynie przyczynku do dyskusji. Przedstawiony cykl badań stanowi nowe i znaczące osiągnięcie naukowe, który należy uznać za istotny wkład w badaną dziedzinę nauki. Jednocześnie wskazuje liczne ścieżki badawcze wynikające z uzyskanych przez nią wyników.

Metodyka badań została prawidłowo dobrana i w odniesieniu do większości przypadków wystarczająco opisana. Największym zarzutem względem metodyki jest brak analizy statystycznej niektórych wyników. Przekazany do recenzji manuskrypt jest bardzo dobrze napisany i starannie zredagowany. Czyta się go bardzo przyjemnie. Zawiera nieliczne błędy o charakterze edytorskim, które z racji obowiązków recenzenta zmuszony jestem wskazać. Ryciny 1, 3, 4 i 23, oraz tabela 1 (opisy tabel powinny być zlokalizowane nad tego typu obiektem) nie mają odnośników w tekście pracy. W tabelach przedstawionych w ramach rycin 8 i 14 określenie „wartość spadku” zostało niepoprawnie użyte – zacytowane liczby przedstawiają wartość względem poziomu wyjściowego (T0), a nie różnicę wartości. Zastosowane są także skróty myślowe np. „...długi (2,6kpz) fragment poprzedzającego go białka LiaR...” – 3'UTR nie jest fragmentem białka tylko kodującego go transkryptu. W wielu miejscach brak odnośników do literatury źródłowej cytowanych wyników obcych. Aczkolwiek błędy te nie mają charakteru merytorycznego i nie wpływają na moją pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji dysertacji.

Uzyskane przez Panią mgr Martę Hubisz wyniki badań i ich interpretacja stanowią nowość i znaczny wkład w dyscyplinę nauk biologicznych. Mają one duże znaczenie dla zrozumienia procesów związanych z funkcjonowaniem receptorów kiełkowania przetrwalników bakteryjnych. Bardzo ciekawa i dogłębna dyskusja potwierdza szeroką wiedzę Doktorantki w poruszanej przez Nią tematyce. Rolą recenzenta jest krytyczne spojrzenie na prezentowane badania oraz wskazanie możliwości ich poszerzenia i udoskonalenia. Przedłożoną do recenzji pracę doktorską Pani mgr Marty Hubisz przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Stwierdzam, że spełnia ona wymagania formalne stawiane rozprawom dysertacyjnym na stopień doktora.

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja spełnia ustawowe wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W mojej ocenie Doktorantka osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniającej ją o ubieganie się o stopień doktora. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie tej pracy i dopuszczenie Pani mgr Marty Hubisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. URP *dr hab. Marcin Schmidt*

profesor Uczelni