



UNIwersytet Warszawski Wydział Biologii

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106

e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 29. 06. 2022.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR MARTY HUBISZ

„Analiza funkcjonalna receptora GerA w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*”

Promotor: prof. dr hab. Michał Obuchowski

Promotor pomocniczy: dr hab. Adam Iwanicki

Bacillus subtilis to bakteria, której znaczenie dla mikrobiologii jako organizmu modelowego, a także dla biotechnologii jako organizmu produkcyjnego jest powszechnie znane i istotne. Szczepy *Bacillus subtilis* występują w środowisku powszechnie, można je także znaleźć w składzie mikrobiomu jelita człowieka. Ważną cechą tej bakterii jest zdolność do formowania wysoce odpornych form przetrwalnikowych – endospor. Formy te pozwalają przetrwać bakteriom w niesprzyjających dla rozwoju warunkach środowiska, często w ekstremalnych temperaturach, w środowiskach ubogich w składniki pokarmowe i wodę, a także przyczyniają się do rozprzestrzeniania się w przyrodzie. Jak wykazano, przetrwalniki *Bacillus* są najtrwalszymi strukturami komórkowymi wytwarzanymi przez żywe organizmy na Ziemi, co powoduje, że są w stanie przetrwać działanie wysokich temperatur, ekstremalnych ciśnień, próżni kosmicznej, promieniowania UV. Ta właśnie tematyka, obejmująca zagadnienia z obszarów genetyki i biologii molekularnej *Bacillus subtilis* oraz procesu kiełkowania spor *Bacillus*, a także wykorzystania ich jako wektorów przenoszących dowolne antygeny jest przedmiotem aktywności badawczej naukowców z Zakładu Mikrobiologii Molekularnej kierowanego przez Pana prof. dr hab. Michała Obuchowskiego - promotora pracy doktorskiej Pani mgr Marty Hubisz.

Rozprawa doktorska Pani mgr M. Hubisz wpisuje się doskonale w tematykę prac naukowych realizowanych przez Zespół Prof. dr hab. M. Obuchowskiego. Promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej jest Pan dr hab. Adam Iwanicki, który od lat jako członek Zespołu realizuje badania nad wykorzystaniem przetrwalników *Bacillus* w procesie immunizacji człowieka i zwierząt.

Dysertacja ma formę klasyczną i składa się z następujących rozdziałów: Streszczenie, Wstęp – omawiający bardzo szczegółowo badania nad procesem kiełkowania u bakterii, Cel pracy, Wyniki, Dyskusja, Materiały, Metody, Bibliografia (ponad 200 pozycji) oraz Załączniki opisujące zestawienie sekwencji aminokwasowych białek A bakterii przetrwalnikujących. Całość pracy to 118 stron tekstu z tabelami i rycinami.

Punktem wyjściowym pracy doktorskiej mgr Marty Hubisz były wcześniejsze wyniki badań Pana Prof. M. Obuchowskiego i współpracowników, którzy w 2018 roku wykazali, że elementy 299 i 302 podjednostki GerA A są istotne dla prawidłowego funkcjonowania procesu kiełkowania u *Bacillus subtilis* przy udziale receptora kiełkowania GerA. Obiektem badawczym tej rozprawy są więc bakterie gramdodatnie *Bacillus subtilis* i szczegółowa analiza procesu kiełkowania tej bakterii. Jednak ze względu na to, że receptory kiełkowania Ger są białkami transbłonowymi, ukrytymi przed środowiskiem zewnętrznym w strukturach przetrwalnika, a także nie wykazują podobieństwa do znanych molekuł, zarówno pod względem budowy jak i funkcji, zastosowanie do badań wielu standardowych procedur badawczych jest mocno utrudnione bądź niemożliwe. To wszystko powoduje, że białka kiełkowania, a w tym GerA, są wciąż stosunkowo słabo poznane. Mimo przewidywanych trudności metodycznych doktorantka postawiła jasne cele badawcze i postanowiła je zrealizować. Problemem wyjściowym dla badań była ocena możliwości wizualizacji wszystkich białek kodowanych w operonie gerA. Kolejne wyznaczone zadanie badawcze to wykazanie wpływu pozycji P324 receptora Ger A w białku A. Zbadanie poziomu ekspresji genów operonu gerA w szczepach z różnym tłem genetycznym i różnymi konfiguracjami w ułożeniu genów operonu oraz powiązaniem tego z efektami fenotypowymi obserwowanymi w procesie kiełkowania to ogólna charakterystyka kolejnego zadania. Docelowo Doktorantka postanowiła zaproponować możliwy sposób działania kompleksu receptora GyrA w procesie inicjacji kiełkowania przetrwalników *Bacillus subtilis*. Część wynikowa pracy jest poprzedzona obszernym wstępem, na który chciałbym zwrócić szczególną uwagę, albowiem został on napisany bardzo wyczerpującym i ładnym stylem, dzięki czemu przeczytałem go z dużą przyjemnością. Z punktu widzenia Redaktora czasopisma mikrobiologicznego uważam, że wstęp ten mógłby z całą pewnością być wydany jako świetna praca przeglądowa na temat kiełkowania spor *Bacillus subtilis*. Większość przedstawionych wyników opatrzonego informacjami wstępnymi, pomagającymi wejście w skomplikowane meandry regulacji genetycznej w procesie kiełkowania.

Analiza mutacji pozycji P324 w białku A receptora GerA i ich wpływu na jego działanie obejmuje znaczną część pracy eksperymentalnej tej rozprawy doktorskiej. Realizując postawione cele badawcze Pani mgr Marta Hubisz zastosowała szeroki wachlarz metod i technik eksperymentalnych zakresu mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej i bioinformatyki. Wykazując się doskonałym opanowaniem zastosowanych technik Doktorantka wykazała ewidentnie, że mutacje te powodują znaczące zmiany w działaniu receptora. Analizy kiełkowania przeprowadzone na przetrwalnikach szczepów P324S i P324G pokazały, że receptor nie tylko nie odróżnia germinantu od inhibitora, ale również zanikł efekt regulacji wydajności kiełkowania przetrwalników przez zmianę stężenia germinantów (L-alanina, L-walina). Wyniki te sugerują, że mutacja w pozycji P324 białka A powoduje zmianę konformacji białka na stale aktywną. Tak więc wykazano, że podobnie, jak wcześniej opisana mutacja P3256, także

przez Doktorantkę badane mutacje doprowadzają do zmiany zachowania się receptora kielkowania. W kolejnym etapie pracy doktorskiej próbowano określić związek między ekspresją genów operonu *gerA* a działaniem receptora. Należy uznać te badania za nowatorskie, albowiem brakuje wciąż w literaturze danych na temat transkrypcji operonu *gerA* i jego translacji są jeszcze bardziej ograniczone niż dane strukturalne na temat białek tworzących kompleks receptora. Przeprowadzono analizę ekspresji genów operonu *gerA* i wykazano, że poziom transkryptu dla poszczególnych genów operonu różni się. Jednak przedstawiona w pracy analiza nie była w stanie rozróżnić transkryptów z nici kodującej i komplementarnej, przez co obserwowano prawdopodobne zawyżenie sygnału w przypadku *gerAB* i *gerAC*. W obecnym stanie metodycznym nie dało się uzyskać pełnej informacji o rzeczywistym przebiegu procesu. Nieoczekiwanym wynikiem stało się to, że prawie zawsze najwyższym poziomem ekspresji charakteryzował się gen *gerAB*, niezależnie od badanego szczepu czy punktu czasowego analiz. Wynik ten pozostaje w całkowitej niezgodzie z aktualną literaturą, która na temat receptora GerA zakłada równocenną ekspresję genów operonu, a tym samym podobną ilość powstałych białek. Brak oczekiwanych wyników został dobrze wyjaśniony przez Doktorantkę z dużym prawdopodobieństwem możliwości występowania w tym niezwykle skomplikowanym systemie regulacji genetycznej. Mechanizm działania kompleksu białek GerA został przedstawiony w modelowo w dyskusji pracy, gdzie Doktorantka przy pomocy licznych schematów starała się w miarę możliwości wyjaśnić te mechanizmy. Ale ciekawy jestem w jakim stopniu możliwe jest inne wytłumaczenie tego niespodziewanego wyniku? Drugie pytanie do doktorantki jest w zasadzie techniczne. Opisuując możliwości detekcji białek produktów badanego operonu Doktorantka wskazuje na niemożliwość oceny ich zróżnicowania. Czy próbowano zastosować technikę Western w wersji dot-blot? Jaka jest opinia Doktorantki w tej kwestii, albowiem bardzo ciekawe byłoby niewątpliwie porównanie ilości białek w badanych szczepach względem danych literaturowych. Wysoki poziom przeprowadzonych eksperymentów, różnorodność i nowoczesność zastosowanych technik, a wreszcie nowatorstwo podejścia i rozwiązań badawczych zastosowanych przez Doktorantkę w wyjaśnianiu zjawisk biologicznych zasługują na pozytywną ocenę. Praca ma charakter poznawczy, a także z punktu widzenia możliwości zastosowania szczepów *Bacillus subtilis* w biotechnologii, ma także charakter aplikacyjny. Moim zdaniem najważniejszymi osiągnięciami naukowymi Doktorantki jest:

1. Skonstruowanie plazmidów rekombinowanych i sprawne przeprowadzenie precyzyjnej mutagenizacji operonu *gyrA*.

2. Udowodnienie bez zastrzeżeń, że geny a, b, c operonu *gerA* charakteryzują się zróżnicowanym poziomem i czasem ekspresji, co może przyczyniać się do różnic w poziomie wydajności kiełkowania przetrwalników za pośrednictwem receptora GerA.
3. Opisanie na podstawie uzyskanych wyników możliwego modelu procesu kiełkowania spor u *Bacillus subtilis*.

Z obowiązku recenzenta zaznaczam, że drobne uwagi edytorskie zaznaczyłem w tekście rozprawy doktorskiej i nie mają one żadnego znaczenia dla oceny tej pracy doktorskiej. Stwierdzam również, że wyniki opisane w rozprawie doktorskiej mgr M. Hubisz nie zostały dotychczas opublikowane. Chciałbym także dowiedzieć się o planach Doktorantki w tym względzie podczas obrony.

Reasumując stwierdzam, że przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską mgr Marty Hubisz oceniam bardzo pozytywnie i uważam, że spełnia ona w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka zrealizowała postawione przed nią cele naukowe, przy zastosowaniu wielorakich podejść badawczych oraz różnorodnych metod z zakresu mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej oraz bioinformatyki.

W związku z powyższym, stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Hubisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 29. 06. 2022 r.