

wpi. 2.05.2018 l. e

# NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



<http://www.nil.gov.pl>

Sekretariat (22) 851-43-69  
Dyrektora: (22) 851-44-96

Kancelaria (22) 841-36-51  
Fax: (22) 841-06-52

Warszawa, 30. Kwietnia 2018

dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL  
Zakład Biotechnologii Leków i Bioinformatyki  
Narodowy Instytut Leków

**Recenzja rozprawy doktorskiej „Wpływ odpowiedzi ścisłej na zdolności przystosowawcze bakterii do zmiennych warunków środowiska” pani magister Klaudii Milewskiej**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii Uniwersytetu Gdańskiego. Rozprawa została zaprezentowana w klasycznej formie i zawiera standardowe części publikacji naukowej, czyli Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję wraz ze spisem literatury cytowanej w tekście, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wyodrębnionymi celami pracy. Praca zawiera również spis treści i listę użytych skrótów, bez spisu tabel i rycin.

Przedstawiona praca jest bardzo obszerna (201 numerowanych stron), co sprawia, że tekst jest miejscami niejednorodny przechodząc od bardzo skondensowanych fragmentów opisu do dość ogólnych i mniej konkretnych. Widać to szczególnie we wstępie, który moim zdaniem mógłby zostać znacząco skrócony w początkowej części opisowej. Początkowa część zawiera informacje dotyczące bakterii

badanych w przedstawionej pracy. W celu skrócenia Wstępu można było również nie zamieszczać zdjęć bakterii z mikroskopu świetlnego, które raczej nie wnoszą istotnych informacji do tekstu. Musze również przyznać, że w tej części nie do końca podobało mi się użycie odnośników do strony <https://microbewiki.kenyon.edu/> jako opisu określonych grup bakterii. Zamiast tego, powinien raczej pojawić się odnośnik do ogólnie przyjętych referencji dotyczących systematyki bakterii jak na przykład Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Pierwsza część wstępu w jasny sposób przedstawia środowisko bytowania badanych bakterii i stresi na jakie są narażone w określonym środowisku.

Druga część wstępu w wyczerpujący i dokładny sposób podsumowuje stan wiedzy dotyczący mechanizmów odpowiedzi ścisłej i roli (p)ppGpp w regulacji ekspresji genów. Przedstawione zostały wszystkie aspekty pośredniego i bezpośredniego (p)ppGpp wpływu na proces transkrypcji, które pozwalają na późniejszą analizę i interpretację wyników.

Ze względu na obszerność pracy autorka nie ustrzegła się błędów redakcyjnych takich jak niekonsekwencje używania np. *Escherichia coli*/*E. coli*, cytowanie w tekście rycin w złej kolejności (ryc. 5 i 6), czy zła numeracja części podrozdziałów w Materiałach i Metodach. Musze jednak przyznać, że jak na tak długą rozprawę tych drobnych potknięć jest mało, a ja jako recenzentka jeszcze nigdy nie spotkałam się z pracą, która by była ich pozbawiona.

Następnie doktorantka przedstawia cel swojej pracy. Moim zdaniem cel główny jest bardzo szeroki, a było nim określenie roli czynników odpowiedzi ścisłej w procesach adaptacji bakterii do niekorzystnych warunków środowiskowych. Ze względu na dużą ogólność założeń, sprecyzowano dodatkowo cele szczegółowe. Szczegółowe cele jakie postawiła sobie doktorantka to zbadanie wpływu odpowiedzi ścisłej na regulację transkrypcji promotorów tRNA u *Escherichia coli* oraz zbadanie zdolności indukcji odpowiedzi ścisłej u bakterii morskich.

Kolejnym rozdziałem rozprawy są Materiały i Metody. Jest to rozdział niezwykle rozbudowany i zawierający moim zdaniem ogromną ilość zbędnych informacji. Podawanie składu komercyjnie dostępnych podłoży, czy standardowych buforów, które są ogólnie dostępne nie wnosi wiele do pracy, można w takich przypadkach powołać się na referencję do podręczników jak np. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (obecnie dostępne już 4 wydanie). Jeżeli różnego rodzaju podłoża używane do eksperymentów jak np. podłoża mineralne MOPS są autorskim dziełem doktorantki powinno to być zaznaczone w tekście, jeżeli nie, powinien być podany odnośnik do źródła. Z drugiej strony opis szalenie istotnych materiałów używanych w eksperymentach jak np. oczyszczony ppGpp czy oczyszczone białka

jest potraktowany w sposób szalenie zdawkowy. Podobne uwagi odnoszą się również do opisu metod. Z jednej strony autorka opisuje elementy transformacji jak np. komórek kompetentnych w włączeniu symbolu rotora używanego do przygotowania komórek, a z drugiej strony podaje, że procedura opiera się na jednym z wydań *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Rozdział Materiały i Metody mógłby zostać skrócony, powinny zostać podane odnośniki do konkretnych publikacji opisujących metody. O ile zadaniem takich rozdziałów powinno być przekazanie informacji pozwalającej na odtworzenie wykonanych eksperymentów, nadmierne szczegóły zaburzają odbiór tego co doktorantka zrobiła ogromnym nakładem pracy.

Rozdział „Wyniki” zawiera opis wykonanych eksperymentów wraz z rycinami je przedstawiającymi (od ryciny 15 do 46). W tym rozdziale doktorantka opisuje wpływ ppGpp i białka DksA na transkrypcję z promotorów tRNA. Do badań wykorzystano głównie transkrypcję *in vitro*. Dla każdego z badanych promotorów badano wpływ zmieniających się stężeń ppGpp, DksA i kombinacji obydwu. Musze przyznać, że o ile graficzne przedstawienie wyników na rycinie 16 jest niezwykle przejrzyste i informatywne, to tabela 21 zawiera szalenie dużo informacji, które częściowo pokrywają się z ryciną 16. Być może podsumowanie w formie samego wykresu słupkowego przedstawiające aktywność promotorów (pomarańczowe słupki w tabeli) dla kontroli i najwyższych zastosowanych stężeń ppGpp i/lub DksA byłoby bardziej przejrzyste.

W kolejnym zestawie doświadczeń doktorantka badała wpływ ppGpp i/lub DksA na stabilność otwartych kompleksów rejonu promotorowego i polimerazy RNA. Wyniki tych eksperymentów zostały pokazane na rycinie 17 i podsumowane w tabeli 22. Podobnie jak we wspomnianych powyżej eksperymentach tabela 22 jest mało czytelna, zamiast stopniowania kolorów w tabeli być może lepiej byłoby użyć wykresu w formie histogramu.

Na podstawie tych dwóch grup doświadczeń doktorantka wybrała 7 promotorów, które następnie badała pod kątem wpływu czynników odpowiedzi ścisłej na wydajność opuszczania rejonu promotorowego przez polimerazę RNA i wiązanie polimerazy. Drobną uwagę – w tytule podrozdziału 5.1.5 doktorantka wspomina polimerazę DNA, podczas gdy eksperymenty opisują opuszczanie promotorów przez polimerazę RNA.

Druga tematyczna część wyników dotyczy bakterii morskich i występujących u nich systemów odpowiedzi ścisłej. Doktorantka rozpoczyna od porównania sekwencji białek RelA i SpoT odpowiedzialnych za metabolizm ppGpp z ich homologami z *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii* i

*Vibrio harveyi* i identyfikowała potencjalne miejsce wiązania Rel A do rybosomy. Następnie przy użyciu oczyszczonych rybosomów doktorantka przeprowadziła syntezę ppGpp, która wykazała, że w zastosowanych warunkach *in vitro* synteza nie zachodzi.

Stres na jaki mogą być narażone bakterie dotyczy często temperatury, zasolenia, zmian pH, dostępność składników odżywczych, zmiany procesów komórkowych jak np. zaburzenia replikacji czy uszkodzenia DNA. Doktorantka zbadala wpływ różnego rodzaju stresu na indukcję odpowiedzi ścisłej u bakterii morskich *in vivo* i wykazała, że w większości przypadków dochodzi do syntezy ppGpp.

W Dyskusji doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki i w dojrzały sposób omawia je w odniesieniu do literatury. W mojej opinii jest to najlepsza i najbardziej wyważona część pracy

Na podstawie lektury nasunęło mi się kilka pytań i chciałabym poprosić doktorantkę o poszerzenie wiedzy dotyczącej *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii* i *Vibrio harveyi*.

1. Na podstawie danych genomowych wiadomo, że poszczególne izolaty w obrębie jednego gatunku bakterii mogą się znacząco różnić od siebie. Czy w sekwencjach innych genomów *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii* i *Vibrio harveyi* występują homologe RelA i SpoT i jaki jest ich podobieństwo do sekwencji analizowanych w przedstawionej rozprawie?
2. Czy w genomie *Shewanella baltica*, *Acinetobacter johnsonii* i *Vibrio harveyi* występują inne homologe niż tylko homolog RelA i SpoT np. homologii znanych z innych mikroorganizmów RelP czy RelQ?
3. Jaki wpływ na odpowiedź ścisłą mogą mieć wpływ potencjalne zmiany sekwencji aminokwasowej białek RSH w obrębie gatunku. Czy u najlepiej pod tym kątem zbadanej *Escherichia coli* obserwuje się zależność sekwencji białkowej RelA i SpoT od poziomu/wydajności odpowiedzi ścisłej?

## **Podsumowanie**

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pani magister Klaudii Milewskiej w powstanie rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie

problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z prośbą o dopuszczenie pani magister Klaudii Milewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Izabela Sitkiewicz