

**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

www.biotech.uni.wroc.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl/zmm

Wrocław, 05.11.2023

Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Janczak pt.:**„Badania systemu toksyna-antytoksyna PemIK_{Sp} z *Staphylococcus pseudintermedius*”**

Badania nad mechanizmami działania systemów toksyna-antytoksyna (TA), oprócz znaczenia poznawczego, mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii zwalczania bakterii chorobotwórczych, zwłaszcza tych opornych na wiele antybiotyków. Jedną z takich strategii może być tzw. "detonacja wewnętrznej bomby," która polega na uwalnianiu toksyn w danym szczepie chorobotwórczym. Celowe obniżenie poziomu antytoksyny lub jej degradacja prowadzi do akumulacji wolnych toksyn, co skutkuje śmiercią komórek bakteryjnych. Celem ocenianej rozprawy doktorskiej było poznanie systemu toksyna-antytoksyna PemIK_{Sp} występującego u *Staphylococcus pseudintermedius*, bakterii wywołującej infekcje głównie u psów, a rzadziej u kotów. Analizowane białka tego systemu są kodowane przez geny znajdujące się na chromosomie *S. pseudintermedius*. Systemem PemIK został odkryty przez zespół dr hab. Benedykta Władyki u *Staphylococcus aureus* jako nowy rodzaj układu toksyna-antytoksyna, należący do systemu typu II. Co ciekawe, w przeciwieństwie do *S. pseudintermedius*, geny kodujące te białka są zlokalizowane na plazmidzie.

Rozprawa doktorska Moniki Janczak stanowi kontynuację badań zespołu dr hab. Benedykta Władyki, który zajmuje się m.in. bakteryjnymi systemami toksyna-antytoksyna oraz proteazami bakterii chorobotwórczych. Forma ocenianej rozprawy doktorskiej ma charakter tradycyjny i składa się z następujących rozdziałów: Wprowadzenia, Celu Pracy, Materiałów i Metod, Wyników i Wniosków, Dyskusji oraz Podsumowania.

W obszernym Wstępie (45 stron), Doktorantka omówiła osiem systemów TA oraz ich funkcje. Nie jestem pewna, czy konieczne było tak szczegółowe przedstawienie wszystkich ośmiu systemów TA, czy może lepiej byłoby skoncentrować się na systemie TA, do którego należy PemIK_{Sp}. Jedną z istotnych informacji jest omówienie struktur PemK i PemIK u *S. aureus* (Kim i wsp., Nucleic Acids Res., 2022), szczególnie biorąc pod uwagę, że ta informacja jest

później wykorzystywana w rozdziale "Dyskusja". Ostatnią część Wstępu Doktorantka poświęciła *S. pseudintermedius*, gronkowcowi, który został odkryty stosunkowo niedawno.

Cel pracy jest również szczegółowo omówiony; najpierw przedstawiono planowane analizy, a następnie skoncentrowano się na omówieniu dwóch kluczowych etapów prowadzonych badań.

W rozdziałach „Materiały i Metody”, Doktorantka starannie opisała używane pożywki, substancje, enzymy oraz procedury eksperymentalne, w sposób, który umożliwia powtórzenie doświadczeń bez większych trudności. Na szczególną uwagę zasługują estetycznie przygotowane tabele.

Rozdział „Wyniki” można podzielić trzy zasadnicze części:

- (i) *in silico*, której celem było analiza sekwencji genów wchodzących w skład operonów *pemIKSal-Sp* i sekwencji aminokwasowej białek sytemu *PemIK_{Sal}-Sp*, a także analiza dystrybucji sekwencji CTATTT w genomach *S. pseudintermedius*.
- (ii) Analiza funkcjonalności białek sytemu *PemIK_{Sal}-Sp* i aktywności toksyn *PemK_{Sal}-Sp* i antytoksyn *PemI_{Sal}-Sp*.
- (iii) Analiza struktury trzeciorzędowej toksyn *PemK_{Sal}-Sp*.

Wykorzystanie zróżnicowanej metodologii, w tym technik *in silico*, *in vitro* i *in vivo*, umożliwiło przeprowadzenie kompleksowej analizy funkcji systemu *pemIKSa1-Sp* chorobotwórczego gronkowca *S. pseudintermedius*.

Rozprawa doktorska tradycyjnie kończy się rozdziałem „Dyskusja”, w którym Doktorantka omawia własne wyniki na tle literatury przedmiotu. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały, a w każdym z nich osobno zostały omówione w sposób krytyczny najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji doktoratu. Taka organizacja rozdziału „Dyskusja” znacząco ułatwia jej czytanie oraz swobodne poruszanie się po tym rozdziale. Niektóre z fragmentów „Dyskusji” są powieleniem rozdziału „Wyniki”, ale zdaje sobie sprawę z tego, że przy tak dużej różnorodności danych doświadczalnych, przytaczanie wyników jest często konieczne dla lepszego zrozumienia toku dyskusji. Warto podkreślić, że Doktorantka w

sposób dojrzały, a przede wszystkim krytyczny, przedstawia własne wyniki na tle obszernej literatury przedmiotu. Na szczególną uwagę zwraca pogłębiona dyskusja dotycząca różnic w strukturze pierwszorzędowej i przestrzennej między PemKsa1-Sp2 a PemKsa oraz swoistości obu białek względem RNA w kontekście tych różnic.

Cenne jest również podsumowanie rozprawy doktorskiej, w którym Doktorantka sformułowała najważniejsze wnioski dotyczące aktywności i struktury toksyn.

Praca jest w zasadzie napisana poprawnym językiem i pod względem formalnym nie budzi większych zastrzeżeń. Mam jednak liczne uwagi:

1. W wielu miejscach rozprawy są liczne błędy językowe, w tym kalki językowe. Przykładowo: ilość (zamiast liczba); „...w balansie pomiędzy tymi dwoma komponentami...”; strona 19, „...daje argument..”; strona 29, „...rejon....wzbogacony był w miejsca kwasowe.”; strona 51, „nadekspresja toksyny”; strona 61, „Zdeterminowanie konsekwencji występowania różnic....”; strona 106 „pik”; strona,125, „Ogół rezultatów...”.

2. Często terminologia naukowa jest niewłaściwa. Przykładowo: strona 16, rys. 1, „Translacja operonu...”; strona 17, „układ immunologiczny” (powinno być odpornościowy; strona 19 „...antysensownego związania...”; strona 68, tabela 8 i strona 77, „wstawka”; strona 74 „medium” (zamiast pożywka); strona 128, „Rozpad kodowanych chromosomowo systemów TA w wyniku obecności mutacji punktowych...”; strona 130, „...istotności w fizjologii gospodarza”; strona 135, „...właściwości RNazowe tych białek...”, czy też poszukiwanie sekwencji CUAUU w genomach.

3. Wiele rysunków prezentowanych w rozdziale Wyniki (przykładowo rysunek 5, 7 i 10 na stronach 92, 98 i 104 odpowiednio) zostało zaczerpniętych z artykułu Doktorantki i dlatego w podpisie tych rysunków powinna znaleźć się informacja, że pochodzą one z publikacji (Janczak i wsp., Microbiological Research 240, 2020).

4. Nie wiadomo, dlaczego tytuł podrozdziału z „Materiałów i Metod” jest taki sam jak tytuł podrozdziału „Wyniki” („Analiza dystrybucji sekwencji CUAUUU w genomach *S. pseudintermedius*”).

5. Tabela 12, link do programu pemNETstat jest nie aktywny.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka wątpliwości/pytań, o ustosunkowanie się do których proszę Doktorantkę:

1. Rys. 5, strona 95: wytypowane miejsce RBS występuje w obrębie genu kodującego antykosynę. Czy Doktorantka próbowała eksperymentalnie określić miejsce startu syntezy mRNA? Czy oba geny są pod kontrolą tego samego promotora, czy dwóch różnych? W jaki sposób można zanalizować transkrypcję tych genów?

2. Proszę zaproponować polską nazwę dla komórek typu „*presisters*”.

3. Strona 99: w opisie procedury renaturacji toksyny nie sensu podawać, ile mikrolitrów naniesiono na żel poliakrylamidowy, jeśli nie jest napisane z jakiej wyjściowej objętości hodowli (itp.) izolowano tę toksynę. Co więcej, na rysunku 8A, nie ma sensu pokazywać żelu ilustrującego próby renaturacji toksyny, jeśli podane są tylko kolejne numery buforów i brak innych szczegółów. Podobnie, na stronie 106, powinna być podana objętość hodowli i inne istotne szczegóły związane z izolacją białka.

4. Strona 117: wniosek dotyczący oddziaływania antytoksyny z toksyną PemK_{sal}, czy wszystkie analizowane antytoksyny występowały w formie rozpuszczalnej.

5. Strona 118-120: dlaczego nie zastosowano systemu, w którym białka TA byłyby produkowane w fuzji z różnymi „metkami”.

6. Rozdział 4.2.13, zamiast „Analiza dystrybucji sekwencji CUAUUU w genomach ...”, powinno być: „Analiza dystrybucji sekwencji CUAUUU w sekwencjach potencjalnych mRNA...”. Czy znany jest transkryptom *S. pseudintermedius*? Jeśli nie, to w genomie powinno szukać się motywów CTATTT w sekwencjach nici kodującej potencjalnych genów/operonów.

7. W jakim kierunku powinny podążać dalsze badania nad systemem PemKSal-Sp? Czy planowane są badania *in vivo* mające na celu zbadanie potencjalnej roli tego systemu w reakcji na stres?

8. Czy stosunkowo duża zmienność sekwencji genów pemKSal-Sp świadczy o tym, że geny te nie są niezbędne i mogą w trakcie ewolucyjnego dopasowywania się *S. pseudintermedius* do gospodarzy stać się pseudogenami, by później zostać wyeliminowanymi z chromosomu tej bakterii? Czy istnieją informacje na temat pochodzenia analizowanych szczepów *S. pseudintermedius* oraz objawów klinicznych wywołanych przez poszczególne szczepy tego gronkowca?

9. Dlaczego bakterie chorobotwórcze mają tak wiele genów TA na swoich chromosomach?

Za najcenniejsze osiągnięcie doktoratu uważam, opisanie struktury przestrzennej PemKSal-Sp2 oraz określenie swoistości substratowej tego białka. Ciekawym aspektem doktoratu jest włączenie się Doktorantki w debatę dotyczącą funkcji systemów TA kodowanych na chromosomie bakterii chorobotwórczych.

Reasumując, wyniki jakie uzyskała p. Monika Janczak są interesujące i oryginalne a część z nich została zamieszczona w artykule opublikowanym *Microbiological Research*.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani Moniki Janczak spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Moniki Janczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jolanta Zakrzewska