

Dr hab. Barbara Kędzierska
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
tel. 58 5236054
e-mail barbara.kedzierska@ug.edu.pl

Gdańsk, 12.03.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Kingi Chlebickiej
“Gronkowcowe systemy toksyna-antytoksyna w badaniach omicznych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Kingi Chlebickiej została przygotowana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Benedykta Władyki, prof. UJ oraz pod opieką Pani dr inż. Emilii Bonar, jako promotora pomocniczego.

Niniejsza praca dotyczy wpływu dwóch systemów toksyna-antytoksyna (TA) – SprGF1 oraz PemKI, na zmiany ekspresji genów gronkowca złocistego. Jest to patogen, który sprawia coraz większe problemy kliniczne ze względu na rosnącą antybiotykooporność wielu szczepów, zdolność do syntezy licznych czynników wirulencji oraz wytwarzanie mechanizmów umożliwiających przetrwanie tych bakterii w niesprzyjających warunkach. We wszystkie te procesy potencjalnie mogą być zaangażowane właśnie systemy toksyna-antytoksyna. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę badań skoncentrowanych na wyjaśnieniu tych zależności oraz wybór technik wysokoprzepustowych, które pozwalają na analizę globalnych zmian we wzorze ekspresji genów, uważam za jak najbardziej trafne i uzasadnione. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że Zespół, w którym realizowana była praca doktorska od lat zajmuje się badaniami różnych elementów genetycznych gronkowca złocistego, w tym kodowanych przez te bakterie systemów TA, a więc Doktorantka mogła liczyć na fachową opiekę merytoryczną.

Praca ma postać monografii liczącej 114 stron, dodatkowo opatrzonej załącznikiem w formie tabeli zawierającej wykaz genów *S. aureus*, których ekspresja uległa zmianie po indukcji toksyn PemK_{Sa} i PemK_{Sd}. Rozprawa ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Wstęp poprzedzają szczegółowy spis treści, wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Wstęp został podzielony na kilka części, z których trzy pierwsze dotyczą systemów toksyna-antytoksyna, kolejny jest poświęcony gronkowcowi złocistemu jako modelowi prezentowanych badań oraz na zakończenie omówione zostały techniki wysokoprzepustowe umożliwiające badania transkryptomów i proteomów. Uważam, że treść podrozdziałów Wstępu została właściwie dobrana i dobrze wprowadza w tematykę badań. Jedynie w części dotyczącej roli systemów toksyna-antytoksyna zabrakło mi najnowszej literatury – w większości cytowane są prace sprzed ponad 10 lat, a jest dużo nowych doniesień prezentujących różne spojrzenia na ten, budzący wiele kontrowersji w środowisku naukowym, temat. Sporym uchybieniem jest na pewno cytowanie pracy dotyczącej roli modułów TA w powstawaniu komórek typu persisters, która już kilka lat temu została wycofana (Maisonneuve i in. PNAS, 2011). Muszę również zauważyć, że podrozdziały dotyczące gronkowcowych systemów TA łącznie z rycinami, zostały opracowane w głównej mierze na podstawie publikacji pt. „Toxin-Antitoxin Systems of *Staphylococcus aureus*” (Schuster & Bertram, Toxins, 2016), a praca ta ani razu nie została zacytowana w tych miejscach dysertacji (jest cytowana w innych miejscach rozprawy). Autorka rozprawy nie wspomniała również o kolejnych systemach TA zidentyfikowanych stosunkowo niedawno u *S. aureus* - o trójskładnikowym systemie TMCS (Habib i in., 2020) oraz czterech systemach, *tsaAT*, *tsbAT*, *tscAT* i *tsdAT* (Kato i in., 2019). Ponadto, w podrozdziale opisującym gronkowcowy system YefM-YoeB, w miejscu gdzie jest informacja, że antytoksynę degradowuje proteaza ClpP (strona 19), znajduje się odnośnik do pracy dotyczącej *E. coli* (Zhang & Inouye, 2009), a powinna być zacytowana praca dotycząca *S. aureus* (Donegan i in., 2010). Chciałabym też zwrócić uwagę na nieścisłość w sformułowaniu „...niektóre antytoksyny typu II działają jako represory transkrypcji operonów TA” (strona 18). Otóż zdecydowana większość antytoksyn systemów typu II negatywnie reguluje transkrypcję z własnych promotorów; tutaj należałoby również dodać, że w większości przypadków toksyna jest korepresorem i to właśnie C-końcowa domena antytoksyny jest zaangażowana w jej wiązanie, o czym Doktorantka w ogóle nie wspomniała. Na stronie 22 przy stwierdzeniu „...toksyna PemK_{Sd} również wykazuje aktywność RNazową i nie wykazuje toksyczności względem komórek” – brakuje odpowiedniego cytowania. Zagadnienia dotyczące technik „omicznych” zostały przedstawione w sposób zwięzły i w moim poczuciu wystarczający.

Chociaż tytuł pracy jest sformułowany bardzo ogólnie, to jednak cele pracy zostały uszczegółowione i dobrze przedstawione na tle niedawnych odkryć dotyczących gronkowcowych systemów TA. Autorka rozprawy postawiła sobie dwa główne cele badawcze. Po pierwsze podjęła się oceny wpływu ekspresji antytoksyny SprF1 oraz usunięcia całej kasety SprGF1 na proteom komórkowy i zewnątrzkomórkowy *S. aureus*. Po drugie, postanowiła zidentyfikować i porównać zmiany w profilach transkryptomów oraz białek wydzielanych poza komórki w wyniku ekspresji toksyn PemK pochodzących z dwóch gatunków gronkowca, *S. aureus* i *S. delphini*. Tutaj od razu chciałabym zapytać: **Dlaczego Doktorantka zdecydowała się**

na dwa różne podejścia „omiczne” w swoich badaniach? Jakie Doktorantka dostrzega zalety i ograniczenia związane ze wykorzystaniem transkryptomiki oraz proteomiki i rezultatami otrzymanymi w obu tych podejściach eksperymentalnych?

Kolejnym rozdziałem dysertacji jest część opisująca materiały i odczynniki użyte w pracy. Do tej części mam najwięcej zastrzeżeń. Uważam za zdecydowanie niewystarczające opisy użytych w rozprawie szczepów bakteryjnych i plazmidów. **Czym charakteryzują się, a zarazem różnią szczepy *S. aureus* N315 i SH1000? Dlaczego akurat te szczepy zostały użyte do przeprowadzenia doświadczeń? Jakie inne systemy TA, oprócz badanych, posiadają te szczepy? Czy geny toksyny/antytoksyny były klonowane do użytych wektorów pod własnym czy heterologicznym promotorem? Czy wiadomo, w jakiej liczbie kopii plazmidy użyte w pracy występują w komórkach *S. aureus*? Liczba cząsteczek toksyny oraz antytoksyny powstających z tych wektorów może mieć wpływ na zmiany zarówno jakościowe, jak i ilościowe w ekspresji genów komórkowych i znacząco odbiegać od sytuacji w szczepie typu dzikiego, gdzie na chromosomie istnieje tylko jedna kopia badanego systemu. Poza danymi na temat genów oporności na antybiotyki, nie ma żadnych innych informacji na temat użytych w pracy wektorów plazmidowych.**

Następnym rozdziałem w rozprawie jest część opisująca metody zastosowane w pracy, które w mojej opinii zostały właściwie i wystarczająco przedstawione. Niemniej jednak, zgodnie z informacją zawartą w dysertacji, wszystkie doświadczenia dotyczące przygotowania materiału i analizy RNA-seq, jak również identyfikacji białek metodami MALDI-TOF oraz ESI/TRAP, zostały wykonane przez inne osoby. Czy w takim razie powinny być zamieszczone w pracy? **Prosiłabym o doprecyzowanie, jaki był rzeczywisty udział Doktorantki w analizie i interpretacji tych wyników?** - moim zdaniem nie jest on jasno wyeksponowany w pracy. Mam również uwagę dotyczącą opisu metody strącania białek z użyciem odczynnika TRI Reagent. W pracy Doktorantka napisała, że procedurę wykonano według instrukcji producenta, ale nie podała jego nazwy. Uważam, że ta metoda powinna być szczegółowo opisana, bo jest tą z trzech testowanych metod, która okazała się najlepsza i była stosowana do właściwych doświadczeń.

Rozdział prezentujący wyniki obejmuje tylko 25 stron i niestety został napisany w sposób bardzo lakoniczny i w mojej ocenie nie jest wystarczająco dobrze dopracowany, również pod względem graficznym. Ta część rozprawy została podzielona na trzy podrozdziały. Pierwszy krótki, dotyczy oceny efektywności strącania białek za pomocą trzech różnych metod. Kolejny z podrozdziałów prezentuje badania nad wpływem systemu TA SprGF1 oraz samej antytoksyny SprF1 na proteom komórkowy jak i zewnątrzkomórkowy gronkowca złocistego. W tym celu Doktorantka wykorzystwała technikę dwukierunkowej elektroforezy różnicowej (2D-DIGE), a do identyfikacji białek wykazujących zmienioną ekspresję użyła spektrometrii masowej (MS ESI/TRAP). W pracy zostały porównane próby pobrane z hodowli w fazie logarytmicznego

wzrostu, jak i z hodowli w fazie stacjonarnej. Porównano ze sobą proteomy (1) szczepu zawierającego system SprFG1 z mutantem pozbawionym tego systemu, (2) szczepu zawierającego system SprFG1 z mutantem pozbawionym tego systemu, ale posiadającym plazmid z nadprodukcją samej antytoksyny SprF1 oraz (3) szczepu mutantu pozbawionego tego systemu, ale posiadającego plazmid z nadprodukcją samej antytoksyny SprF1 ze szczepem pozbawionym systemu SprFG1. W fazie logarytmicznej we wszystkich trzech testowanych kombinacjach zmianom ilościowym uległy jedynie pojedyncze białka, natomiast w fazie stacjonarnej zaobserwowano już nieco wyraźniejsze różnice w badanych proteomach. Wszystkie zaobserwowane w tych badaniach względne zmiany w poziomach białek okazały się stosunkowo niewielkie – między 1.5 a 2.36. Pokazano, że usunięcie systemu SprGF1 podwyższa ekspresję niektórych białek komórkowych, natomiast nadekspresja antytoksyny SprF1 odwraca ten efekt. Wśród zidentyfikowanych białek trzy były wcześniej powiązane z tworzeniem komórek przetrwałych, co może sugerować rolę antytoksyny SprF1 w tworzeniu tego typu komórek u gronkowca złocistego. Dla czterech genów, dla których zmiana ekspresji była ponad dwukrotna, wykonano reakcje RT-qPCR. Dla trzech z nich zauważono niewielką, ale istotną statystycznie różnicę w ekspresji pomiędzy badanymi szczepami. **Czy Doktorantka ma pomysł na doświadczenia, dzięki którym można byłoby poznać mechanizm, za pomocą którego antytoksyna SprF1 wpływa na ekspresję genów komórkowych?** Został również przeanalizowany i porównany sekretom (komórek będących w fazie stacjonarnej) pomiędzy wyżej wymienionymi parami szczepów gronkowcowych i w tym przypadku zmiany dotyczyły już ponad 40 różnych białek. Te wyniki pokazały, że brak toksyny SprG1 koreluje z obniżonym poziomem białek wydzielanych poza komórkę. Wśród białek wykazujących zmienioną ekspresję, cztery stanowiły białka typowo wydzielnicze, natomiast pozostałe były białkami cytoplazmatycznymi. Ponieważ wiele toksyn systemów TA typu I wpływa na integralność błony komórkowej, Doktorantka postanowiła sprawdzić ilość produkowanej toksyny w różnych fazach wzrostu komórek gronkowca. W badaniach RT-qPCR wykazała 3,5-krotny wzrost ilości toksyny w fazie stacjonarnej względem fazy logarytmicznej. Następnie Pani mgr Chlebicka wykonała analizę western blot, w której pokazała, że wydzielanie białek poza komórkę nie jest spowodowane dezintegracją błony, co sugeruje, że jest to pośredni efekt działania toksyny. W Dyskusji Doktorantka proponuje pewne hipotezy na ten temat, ale żadna z nich to tej pory nie została zweryfikowana eksperymentalnie.

Szkoda, że Doktorantka w swojej rozprawie nie przedstawiła wyników proteomicznych za pomocą diagramów Venna, które zdecydowanie ułatwiłyby wizualizację omawianych rezultatów. W pracy zabrakło informacji w ilu powtórzeniach przygotowywane były próby i z ilu żeli Autorka wyliczyła względne zmiany w ekspresji białek? Na ile istotne statystycznie są obserwowane różnice? Tu mam też pytanie **czy nie byłoby lepiej stworzyć szczep z chromosomalną delecją genu kodującego toksynę SprG1, żeby obserwować wpływ**

antytoksyny SprF1 - w takim układzie powstającej w naturalnej ilości - na ekspresję genów komórkowych? Proszę Doktorantkę o komentarz w tej kwestii. We wstępie Doktorantka podała informację, że u gronkowca złocistego zidentyfikowano cztery homologiczne systemy SprGF (1-4). Czy potwierdzono współwystępowanie któregoś z tych modułów w szczepie *S. aureus* N315? Czy są informacje na temat reakcji krzyżowych pomiędzy badanym systemem, a innymi modułami TA potencjalnie występującymi w użytym szczepie? Jak takie potencjalne interakcje krzyżowe mogłyby wpływać na otrzymane wyniki?

W trzeciej i ostatniej części Wyników Doktorantka przeanalizowała wpływ toksyn PemK pochodzących z dwóch różnych gatunków gronkowca na ekspresję genów *S. aureus*. W tym celu zostały przeprowadzone analizy transkryptomocne w dwóch punktach czasowych licząc od momentu indukcji ekspresji toksyn. Dodatkowo do zbadania poziomu białek w proteomie zewnątrzkomórkowym, Pani mgr Chlebicka wykorzystwała technikę dwukierunkowej elektroforezy różnicowej (2D-DIGE), a do identyfikacji białek wykazujących zmienioną ekspresję użyła spektrometrii masowej (MS MALDI/TOF). **Tutaj chciałabym się spytać z jakiego powodu do identyfikacji białek analizowanych w rozprawie zostały wykorzystane dwie różne techniki – MALDI/TOF oraz ESI/TRAP? Do tych doświadczeń został użyty szczep *S. aureus* SH1000, dodatkowo transformowany plazmidami niosącymi geny toksyn *pemK_{sa}* lub *pemK_{sd}*. Czy użyty szczep nie posiada chromosomalnej kopii modułu PemKI? Co wiadomo na temat obecności innych systemów TA w tym szczepie? Na myśl przychodzą mi znowu potencjalne reakcje krzyżowe, które mogłyby mieć wpływ na uzyskane wyniki.**

Najpierw Doktorantka pokazała, że toksyna PemK_{sd} nie wykazuje toksyczności w stosunku do komórek *S. aureus*, w przeciwieństwie do toksyny PemK_{sa}. **Czy wiadomo czy toksyna PemK_{sd} wykazuje toksyczność w stosunku do komórek *S. delphini*?** Miało to również swoje odzwierciedlenie w badaniach transkryptomocnych, które wykazały, że toksyna PemK_{sa} ma wpływ, zarówno pozytywny jak i negatywny, na dużo większą liczbę transkryptów w porównaniu do toksyny PemK_{sd}. Interesuje mnie **jak wyniki uzyskane dla toksyny PemK_{sa} odnoszą się do wyników z pracy Bukowski i in. (2013), w której autorzy przeanalizowali częstość występowania sekwencji UAUU rozpoznawanej przez tę toksynę w transkryptach *S. aureus*?** - wskazali w niej transkrypty z największą i najmniejszą liczbą takich sekwencji. Jest to ciekawe, gdyż na tej podstawie została zaproponowana hipoteza o regulatorowej roli tej toksyny. Główna konkluzja z tej części rozprawy jest taka, że toksyna wpływa na wiele różnych szlaków metabolicznych *S. aureus*.

W pracy został także przeanalizowany sekretom szczepów z nadprodukcją obu badanych toksyn w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Uzyskane wyniki pokazały, że indukcja białka PemK_{sa} powoduje obniżenie ilości białek wydzielanych poza komórkę. Tu od razu nasuwa mi się pytanie **jak szerzej można interpretować otrzymane w tej pracy wyniki, pokazujące, że usunięcie toksyny SprG1 koreluje z obniżonym poziomem białek**

zewnątrzkomórkowych, a nadprodukcja toksyny PemK_{sa} również daje taki efekt? To pokazuje, że toksyny różnych systemów TA obecnych w komórkach gronkowca złocistego mogą mieć odmienny wpływ na zestaw białek wydzielanych poza komórkę.

Na koniec chciałabym spytać Doktorantkę czy próbowała badać zmiany w ekspresji genów gronkowcowych wywołane przez antytoksynę PemI? Czy wiadomo jakie sekwencje nukleotydowe rozpoznaje ta antytoksyna i czy są one liczne w genomie *S. aureus*? Uważam, że ta kwestia byłaby bardzo ciekawa do zbadania, gdyż pojawia się coraz więcej doniesień, że antytoksyny systemów TA oprócz represji swojego własnego operonu regulują ekspresję innych genów komórkowych, często związanych z wirulencją bakterii.

Jedenastostronicowa Dyskusja dojrzałe i wieloaspektowo prezentuje uzyskane wyniki na tle dostępnej literatury. Ta część pracy, moim zdaniem, jest najlepiej opracowana i pokazuje dociekliwość Pani mgr Kingi Chlebickiej, aby wydobyć z wielkiej ilości danych uzyskanych w eksperymentach transkryptomycznych i proteomicznych jakieś interesujące powiązania genetyczne i metaboliczne. Doktorantka krytycznie przyznaje, że poznanie mechanizmów, za pomocą których badane przez nią komponenty modułów toksyna-antytoksyna wpływają na ekspresję genów gronkowca złocistego, wymaga dalszych szczegółowych badań. W części dotyczącej systemu SprGF1 znalazłam pewną nieścisłość w zdaniu: „W systemach TA, antytoksyna może być odpowiedzialna za regulację transkrypcji własnego operonu – RelB, czy hamowanie promotora genu głównego czynnika odpowiedzi na stres – MqsA” (strony 81/82). Otóż zdecydowana większość antytoksyn systemów typu II działa jako negatywne regulatory własnej ekspresji, co wpisuje się w charakterystykę typowego modułu TA tego typu, a przykładów, że mogą one również regulować ekspresję różnych genów komórkowych, w ostatnich latach przybywa.

Na uwagę zasługuje obszerna bibliografia licząca około 200 pozycji, która może wskazywać na to, że Doktorantka dobrze orientuje się w opisywanej przez siebie tematyce badawczej. Niemniej jednak, jak zaznaczyłam powyżej, moim zdaniem brakuje w tym spisie wielu najnowszych, istotnych z punktu widzenia niniejszej pracy, doniesień literaturowych.

Praca została napisana w zasadzie poprawnym językiem naukowym, jednakże z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na obecność dość dużej liczby błędów stylistycznych i językowych, a także nieprawidłowych sformułowań czy też nietypowych określeń; niektóre dla porządku wymienię: „w chromosomie”, „w plazmidzie” zamiast „na chromosomie” czy „na plazmidzie”, „sekwencje DNA namnożono” zamiast „zamplifikowano”, „nadsącz” zamiast „supernatant”, „rozdział białek na żelu” zamiast „w żelu”, a także: „zbieżne promotory”, „mutant delecyjny suplementowany plazmidem”, „szczepy różnicują dwa białka”, „transkrypty różnicujące”, „utoksyczniać” i „odtoksyczniać”, „geny systemów mogą lokalizować w plazmidach lub chromosomach” oraz „kuweta elektroporacyjna o grubości 0,2 cm” zamiast „kuweta elektroporacyjna o szerokości szczeliny 0,2 cm”. Na stronie 80 dysertacji w Dyskusji

wkradł się błąd – „.....metoda ekstrakcji fenolem i chloroformem za pomocą odczynnika TRI Reagent....” - powinno być „metanolem” zamiast „fenolem”. W podpisie pod ryciną 19 nieprawidłowo opisano legendę – dla PemK_{sd} po 90 minutach ekspresji zidentyfikowano 7 transkryptów o obniżonej ekspresji (czerwone) i brak transkryptów o podwyższonej ekspresji (zielonych).

Ponieważ część pracy dotycząca systemu SprGF1 została już opublikowana w czasopiśmie *Genes* w 2021 roku (doktorantka jest w tej pracy pierwszym autorem) to niewątpliwym uchybieniem jest brak jasnych odniesień do tego faktu w rozprawie doktorskiej. Jedynie w podpisach pod rycinami pochodzącymi z tej pracy znajdują się odpowiednie cytowania. Ta sama uwaga dotyczy części poświęconej opisowi metod stosowanych podczas analizy proteomu, które zostały opublikowane w 2020 roku w *Methods in Molecular Biology*, w której to pracy Pani mgr Chlebicka jest drugim autorem. Ponadto bardzo widoczne jest zbyt duże, w mojej ocenie, podobieństwo tekstu wyników i dyskusji dotyczących systemu SprFG1 z tekstem publikacji - Chlebicka i in. 2021 - która jest pracą wieloautorską i to nie Doktorantka, zgodnie z informacją zawartą w *author contribution*, była główną osobą odpowiedzialną za napisanie tego manuskryptu. Niemniej jednak to, że część uzyskanych przez Panią mgr Chlebicką wyników zaprezentowanych w ocenianej dysertacji, została już opublikowana w dwóch recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, niewątpliwie należy docenić.

Pomimo wskazanych przeze mnie niedociągnięć, rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Chlebickiej stanowi wartościowy wkład w poznanie wpływu białek systemów toksyna-antytoksyna SprGF1 i PemKI na ekspresję genów gronkowca złocistego i daje podstawę do dalszych badań nad rolą tych modułów w kontekście cech związanych z wirulencją *S. aureus*, jak i patogenezą chorób wywoływanych przez te drobnoustroje. Duża liczba pytań, które zawarłam w niniejszej recenzji, wynika w głównej mierze z niedostatecznie szczegółowych opisów otrzymanych wyników, ale mam nadzieję, że Doktorantka udzieli stosownych wyjaśnień podczas publicznej obrony.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Kingi Chlebickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Billpolierska