



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Chlebickiej, pt.

„Gronkowcowe systemy toksyna-antytoksyna w badaniach omicznych”

wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem:

**dr. hab. Benedykta Władyki (promotor rozprawy) i
dr inż. Emilii Bodnar (promotor pomocniczy)**

Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Systemy toksyna-antytoksyna (TA) od dawna koncentrują uwagę wielu badaczy. Tym niewielkim modułom genetycznym pierwotnie przypisywano jedynie funkcje plazmidowych systemów stabilizujących, odpowiadających za posegregacyjną eliminację komórek bezplazmidowych z populacji bakterii. Wyniki dalszych badań diametralnie zmieniły ten obraz. Dzięki rozwojowi genomiki dowiedzieliśmy się, że większość tego typu systemów jest usytuowana w chromosomach, a analiza modelowych *loci* dowiodła ich zaangażowania (w określonych warunkach) m.in. w przebieg tak kluczowych procesów komórkowych, jak translacja białek, replikacja DNA czy biogeneza osłon komórkowych. Systemy te odgrywają ważną rolę w globalnej regulacji aktywności metabolicznej bakterii, w odpowiedzi na warunki środowiska. Udokumentowano ich wpływ m.in. na proces tworzenia biofilmów bakteryjnych, generowanie komórek przetrwałych (ang. *persistor cells*), odpowiedź bakterii na warunki stresowe czy infekcje fagowe.

Mimo postępu badań, wiedza o funkcjonowaniu tych *loci* jest wciąż fragmentaryczna. Daleko jesteśmy od pełnego zrozumienia biologicznej roli tych systemów, zwłaszcza u układach, w których występują one licznie. Co więcej, nawet blisko spokrewnione systemy mogą wykazywać pewne indywidualne różnice, wywołując odmienne efekty u różnych gospodarzy. Nie ulega zatem wątpliwości, że analizy systemów TA powinny być prowadzone w ścisłej relacji z ich bakteryjnymi

gospodarzami – tym bardziej, że wymagają one także szerszego spojrzenia na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach tych mikroorganizmów.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa wpisuje się w ten ciekawy nurt tematyczny, bowiem dotyczy analiz wybranych systemów TA dwóch gatunków gronkowców, w tym *Staphylococcus aureus* – bakterii oportunistycznej, która, ze względu na powszechne (często zagrażające życiu) zakażenia oraz narastająca wielolekooproność, stanowi poważny problem z punktu widzenia zdrowia publicznego. Biorąc pod uwagę znaczenie systemów TA w biologii bakterii, a także możliwość wykorzystania wiedzy na ich temat do stworzenia nowych strategii antybakteryjnych, wybór zarówno tematyki rozprawy, jak i modelu badawczego, uważam za w pełni zasadny.

Ocena formalna rozprawy

Oceniana rozprawa została napisana w języku polskim – liczy 114 numerowanych stron i zawiera 22 ilustracje. Ma ona układ typowy dla prac eksperymentalnych, a przygotowując ją zachowano zrównoważoną proporcję w objętości poszczególnych rozdziałów. Do rozprawy włączono także obszerny załącznik przedstawiający, w formie tabelarycznej, wyniki przeprowadzonych analiz transkryptomicznych. Całość została przygotowana poprawnie pod względem językowym i edytorskim – drobne uchybienia w tym zakresie są nieliczne. Bibliografię opracowano według spójnego stylu, nie ujednotwiono jednak wielkości liter w tytułach cytowanych prac.

Tytuł rozprawy (*Gronkowcowe systemy toksyna-antytoksyna w badaniach omicznych*) jest informatywny, jednak, w mojej opinii, został sformułowany zbyt ogólnie, przez co wydaje się bardziej odpowiedni dla pracy monograficznej niż badawczej. Nie przedstawia on bliżej problemu naukowego ani analizowanych modeli badawczych. Uważam, że powinno to zostać w tytule doprecyzowane.

We Wstępie rozprawy wyraźnie zarysowano dwa główne wątki tematyczne – jeden, naukowy, ściśle powiązany z tematyką systemów TA, a drugi, o charakterze metodycznym, opisujący techniki stosowane w badaniach o wymiarze *omicznym*. Biorąc pod uwagę specyfikę przeprowadzonych badań, dobór tych treści jest właściwy. Z jednej strony przedstawiono ogólny obraz systemów TA gronkowców, przybliżając tym samym czytelnikowi analizowane modele badawcze, a z drugiej, dokonano krytycznej analizy technik eksperymentalnych, co jest pomocne przy ocenie zasadności doboru metod badawczych oraz interpretacji przedstawionych w rozprawie wyników. Wstęp pracy został napisany przejrzyście i odpowiednio prowadzi czytelnika do sprecyzowanego celu badawczego, jakim było zbadanie wpływu dwóch systemów TA, SprG1/SprF1 i PemK/PemI, na profil transkryptomu i proteomu szczepów *S. aureus*. Nie znajduję w rozprawie postawionych hipotez badawczych, dlatego poprosiłbym o ich przedstawienie w trakcie obrony.

Ocena merytoryczna pracy

Badania prowadzone przez Doktorantkę skupiły się na realizacji dwóch głównych zadań badawczych, związanych ze wspomnianymi wyżej systemami TA. Pierwszy wątek dotyczył systemu TA typu I *S. aureus*, kodującego toksynę SprrG1 oraz antytoksynę SprF1 w formie RNA. Inspiracją do przeprowadzenia tych badań były wyniki uzyskane przez innych badaczy, wskazujące m.in. na dualistyczną rolę antytoksyny tego systemu. Zademonstrowano, że antytoksyna ta nie tylko oddziałuje z mRNA toksyny, lecz także (w warunkach stresowych) wchodzi w interakcje z rybosomami i polisomami, co prowadzi do atenuacji translacji i sugeruje udział w generowaniu komórek przetrwałych. Ta niespotykana wcześniej właściwość stanowiła zachętę do zbadania wpływu antytoksyny SprF1 oraz całego systemu SprG1/SprF1 na proteom komórkowy i zewnątrzkomórkowy szczepu *S. aureus* N315.

Badania rozpoczęto od doboru i optymalizacji metodyki pozwalającej na przeprowadzenie analiz proteomicznych. Był to bardzo istotny etap, którego powodzenie było kluczowe dla uzyskania dobrej jakości, powtarzalnych wyników, które pozwalałyby na przeprowadzenia rzetelnych analiz porównawczych proteomów. Konieczne było zatem dobranie odpowiednich metod precypitacji białek komórkowych oraz dokonanie oceny wydajności tych procedur, jakości i rozdzielczości uzyskanych prób białkowych, wykorzystując do tego celu elektroforezę dwuwymiarową. Doktorantka zoptymalizowała warunki tej procedury, a przedstawione wytyczne stanowią dodatkową wartość rozprawy, otwierając pole do przyszłych badań z zakresu proteomiki gronkowców.

Do analiz proteomicznych wykorzystano szczep *S. aureus* N315 oraz dwa szczepy pochodne – jeden z usuniętym z genomu systemem SprG1/SprF1 (N315 $\Delta\Delta$), a drugi będący N315 $\Delta\Delta$ z wprowadzonym plazmidem komplementacyjnym pCN35*sprF1*, zawierającym gen antytoksyny (N315 $\Delta\Delta$ SprF1). Porównano proteomy komórkowe ww. szczepów w dwóch fazach wzrostu (logarytmicznej i stacjonarnej), a także poddano różnicowej analizie sekretomy tych bakterii. Badania te, uzupełnione o kilka dodatkowych eksperymentów, pozwoliły m.in. na stwierdzenie, że: (1) obecność analizowanego systemu TA wywiera pewien wpływ na proteom komórkowy szczepu N315 w optymalnych warunkach wzrostu bakterii, (2) ekspresja antytoksyny w fazie stacjonarnej prowadzi do obniżenia poziomu puli białek, co może potencjalnie stymulować zmianę fenotypu bakterii w kierunku formowania subpopulacji komórek przetrwałych, oraz, że (3) skład sekretomu może być w pewnym stopniu determinowany obecnością w komórce toksyny SprG1, a różnice te mogą mieć potencjalne znaczenie również w procesie patogenezy. Doktorantka poczyniła także kilka dodatkowych obserwacji, sugerujących istnienie zależnej od SprG1 ścieżki wybiórczej sekrecji białek oraz nieopisanych wcześniej zdolności regulacyjnych antytoksyny, wynikających z jej bezpośrednich interakcji z transkryptami niektórych genów. Są to ciekawe sugestie, zachęcające do kontynuacji badań i dalszego rozwoju tej tematyki.

W badaniach wykorzystano plazmid komplementacyjny pCN35sprF1 (nie przedstawiono w rozprawie jego podstawowej charakterystyki, ponadto zastosowano różne formy zapisu jego nazwy – pCN35sprF1 i pCN35SprF1), zawierający sklonowany gen antytoksyny SprF1. Czy gen ten znajdował się pod kontrolą natywnego promotora, czy też wykorzystano w tym przypadku egzogenny system ekspresyjny? System replikacyjny pCN35sprF1 zapewnia wysoką liczbę kopii tego plazmidu w komórkach *S. aureus*, co znacznie podnosi dawkę genu antytoksyny. Niewątpliwie prowadzi to do nadprodukcji RNA, zapewne w stopniu niespotykanym w warunkach fizjologicznych. Czy Doktorantka wyklucza, że może to prowadzić do nadinterpretacji roli antytoksyny, wynikającej z detekcji pewnych oddziaływań, które obserwowane są jedynie w skonstruowanym układzie?

Drugi wątek tematyczny rozprawy dotyczy dwóch systemów TA typu II występujących w różnych gatunkach *Staphylococcus* – *S. aureus* (plazmid) i *S. delphini* (chromosom). Systemy te kodują pokrewne toksyny – rybonukleazy PemK (odpowiednio, PemK_{Sa} i PemK_{Sd}), które, mimo dużego stopnia identyczności sekwencji aminokwasowych, wywołują odmienny efekt w komórkach bakteryjnych, co wskazuje na zróżnicowanie celów ich działania. Doktorantka postawiła za cel zbadanie i porównanie właściwości tych toksyn poprzez analizę zmian profili transkryptomów pochodnych szczepu *S. aureus* SH1000 nadprodukcujących te białka. Uzyskane wyniki ujawniły diametralne różnice w porównywanych transkryptomach. Wpływ PemK_{Sd} na poziom ekspresji genów były znacznie mniejszy i dość szybko był neutralizowany, co tłumaczy zaobserwowany brak toksyczności tego białka wobec komórek bakteryjnych (ciekawe, czy podobny efekt byłby również widoczny przy nadprodukcji PemK_{Sd} w komórkach macierzystego gospodarza – *S. delphini*). Być może znaczna część chromosomowych systemów TA pełni jedynie funkcje modulujące poziom ekspresji genów, nie wywołując przy tym efektu „toksycznego”. Jest to kontrze do aktywności systemów plazmidowych, które zapewne wywodzą się od *loci* chromosomowych. W toku ewolucji zostały wyselekcjonowane w tych replikonach takie warianty systemów, które gwarantowały silny efekt toksyczny, pozwalający na posegregacyjną eliminację komórek bezplazmidowych. Potwierdza to zaobserwowany przez Doktorantkę efekt działania plazmidowej toksyny PemK_{Sa}, która powodowała trwałą zmianę ekspresji ponad 30 % wszystkich genów *S. aureus*, prowadząc do deregulacji wielu procesów metabolicznych. Ciekawą obserwacją było również stwierdzenie wzrostu poziomu ekspresji genów związanych z translacją, budową i biogenezą rybosomów oraz metabolizmem nukleotydów, w odpowiedzi na nadprodukcję obu toksyn, co sugeruje istnienie wspólnego mechanizmu odpowiedzi komórki na stres wywołany obecnością toksyn.

Podsumowując, Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione w rozprawie cele – ogólne i szczegółowe. W toku prac uzyskała dużą ilość danych, które przeanalizowała, a następnie przedstawiła w syntetycznej formie, punktując najważniejsze obserwacje. Wykorzystanie technik *omicznych* pozwoliło Jej na określenie globalnych zmian zachodzących w komórce pod wpływem analizowanych systemów. Wyniki te wnoszą ciekawe wątki do badań nad systemami TA oraz poszerzają ogólną wiedzę na temat roli tych systemów w regulacji ekspresji genów gronkowców.

Najważniejsze obserwacje zostały szczegółowo omówione w Dyskusji i skonfrontowane z aktualnymi danymi literaturowymi. Rozdział ten został napisany dojrzałe, co przekonuje o dużej wiedzy Doktorantki z zakresu poruszanej tematyki. Całość rozprawy była dla mnie ciekawą i inspirującą lekturą, a uzyskane wyniki niewątpliwie skłaniają do kontynuacji badań nad systemami TA gronkowców.

Toksyny systemów TA nie są wydzielane na zewnątrz komórki, działają więc jedynie na bakterię, która je wytwarza. Stawarza to możliwość wykorzystania właściwości obecnych w komórce systemów TA do opracowania nowych, celowanych terapii antybakteryjnych. Czy takie próby są podejmowane w przypadku gronkowców? Które systemy TA tych bakterii, zdaniem Doktorantki, mają największy potencjał (biorąc pod uwagę ich rozpowszechnienie i właściwości) do wykorzystania przy opracowywaniu takich strategii? Na ile wyniki uzyskane w rozprawie są pomocne w takiej ocenie?

Wniosek końcowy

Uważam, że oceniana rozprawa prezentuje wysoki poziom naukowy i przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było określenie globalnych zmian, na poziomie transkryptomu i proteomu, zachodzących w komórkach *S. aureus* pod wpływem komponentów wybranych systemów TA. Rozwiązanie tego problemu wymagało od Doktorantki zarówno rozległej wiedzy z zakresu dyscypliny nauki biologiczne, jak i opanowania złożonego, specjalistycznego warsztatu badawczego, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a także dokonania syntezy uzyskanych danych i wyciągnięcia na ich podstawie uprawnionych wniosków.

W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 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 Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Kingi Chlebickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik