

Prof. dr hab. Igor Konieczny
Zakład Biologii Molekularnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 10.03.2024

Recenzja pracy doktorskiej Kingi Chlebickiej na temat: „GRONKOWCOWE SYSTEMY TOKSYNA-ANTYTOKSYNA W BADANIACH OMICZNYCH”

Praca doktorska Pani mgr Kingi Chlebickiej dotyczy analizy wpływu systemów toksyna-antytoksyna na ekspresję genów oraz proteom patogennej bakterii *Staphylococcus aureus*. Badania systemów toksyna-antytoksyna wskazują, że są one istotne w regulacji wielu procesów komórkowych i mogą warunkować między innymi utrzymanie plazmidowego DNA, odpowiedź komórek na warunki stresowe, sekrecję białek, wirulencję czy powstawanie komórek o fenotypie typu *persisters*. Poznanie mechanizmów regulujących te procesy jest istotne dla powstawania i rozwijania nowych metod terapeutycznych stosowanych dla zwalczania infekcji bakteryjnych w szczególności wywoływanych przez bakterie o fenotypie MDR. Co ciekawe ze względu na mnogość i złożoność systemów toksyna-antytoksyna ich aktywności nie są do końca poznane. W związku z powyższym uważam, że wybór tematu pracy był jak najbardziej uzasadniony a uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę i stanowią istotny wkład dla poznania efektów komórkowych aktywności systemów toksyna-antytoksyna.

Praca została wykonana w na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zakładzie Biochemii Analitycznej. Praca została wykonana pod opieką dr hab. Benedykta Władyki oraz dr inż. Emilii Bonar.

Rozprawa to 114 stron tekstu oraz załącznik zawierający dane transkryptomiczne. W tekście pracy umieszczono 22 ryciny i 14 tabel. Rozprawa ma tradycyjny układ. Na końcu po rozdziale dyskusja znalazło się krótkie podsumowanie otrzymanych wyników i bibliografia. Po stronie tytułowej umieszczono podziękowania, spis treści, wykaz skrótów, a następnie streszczenie pracy przygotowane w języku polskim i w języku angielskim. Edycja pracy jest bardzo staranna. Praca jest napisana bardzo dobrym językiem, w sposób zrozumiały dla czytelnika i zawiera jedynie bardzo nieliczne błędy edycyjne, które nie wymagają poświęcenia im większej uwagi. Przykład to drobne błędy w kolejności wprowadzanych rycin (str. 58) czy też używanie terminu „namnażanie” w kontekście reakcji typu PCR. Termin „amplifikacja” wydaje się być bardziej właściwym. Bardzo dobrze przygotowano ryciny. W szczególności na uznanie zasługują ryciny umieszczone we wstępie pracy, które w graficzny sposób przedstawiają działanie poszczególnych klas systemów toksyna-antytoksyna. Również schematy przeprowadzanych eksperymentów ułatwiają lekturę pracy. Podsumowując, zarówno sposób przedstawienia wyników, poprawność językowa, przejrzystość i spójność tekstu jak i edycję pracy oceniam bardzo wysoko.

Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w lekturę wyników i ich dyskusję przedstawione w dalszych rozdziałach. Autorka opisuje klasy systemów toksyna-antytoksyna oraz techniki stosowane w pracy. Przedstawia ogólny opis technik omicznych i możliwości jakie stwarzają. Podkreślę bardzo dobry syntetyczny opis metod spektrometrii mas. Wstęp tak jak i reszta pracy jest dobrze i zwięźle napisany.

Cel pracy został opisany na stronie 33. W moim odczuciu tekst w tym miejscu nie jest idealny i troszkę zagmatwany co rzutuje na przekaz.

Rozdział Materiały i odczynniki nie budzi żadnych zastrzeżeń. Również dobrze opisano stosowane w pracy metody oraz zakres prac w przypadku zlecenia analiz do wykonania wyspecjalizowanym jednostkom uczelnianym. Nie ma wątpliwości, że udział doktorantki w przygotowaniu próbek i optymalizacji metod był kluczowy.

Rozdział Wyniki znajduje się opis przeprowadzonych eksperymentów. Doktorantka zidentyfikowała najlepszą metodę wytrącania białek z lizatów komórkowych *S. aureus* oraz zoptymalizowała rozdział białek na żelach 2DE. Pozwoliło to na przeprowadzenie analizy proteomicznej szczepów *S. aureus* typu dzikiego oraz z delecją systemu SprG1/SprF1 oraz izogenicznego szczepu zawierającego plazmid pNC35SprF1 z genem antytoksyny. Porównując profile białkowe w fazie logarytmicznego wzrostu hodowli oraz w fazie stacjonarnej, zidentyfikowano białka (odpowiednio 6 i 16), których poziom różnił się w porównaniu do szczepu

typu dzikiego. Analiza profilu białek sekrecyjnych *S. aureus* identyfikowanych w pożywce hodowlanej pozwoliła ustalić odmienny poziom aż czterdziestu kilku białek w tym czterech białek typowo sekrecyjnych. Mechanizm leżący u podstaw tej obserwacji nie został zidentyfikowany.

W dalszej części analizowano wpływ toksyny PemK na ekspresję genów *S. aureus*. Wykazano, że toksyny PemKsa i PemKsd wywierają wpływ na transkryptom *S. aureus*. Nadekspresja PemKsa skutkuje zmianą poziomu 415 transkryptów a nadekspresja PemKsd 146 transkryptów. Tu prosiłbym o komentarz w jaki sposób aktywność toksyn miała by raz obniżać a raz podwyższać poziom transkryptów komórkowych? Jak można tłumaczyć podwyższony poziom transkryptów genów kodujących białka opiekuńcze oraz białka zaangażowane w syntezę DNA? Jaka jest opinia doktorantki na całkowicie odmienny wpływ PemKsa na transkrypty kodujące białka zaangażowane w transport i metabolizm i transkrypty kodujące białka zaangażowane w replikację, rekombinację i naprawę czy też translację, budowę i biogenezę rybosomów?

Również bardzo ciekawa obserwacja dotyczy analizy wpływu toksyny PemKsa i PemKsd na poziomy białek ulegających sekrecji. Doktorantka obserwowała, że ekspresja toksyny PemKsa obniża stężenie określonych białek w pożywce. Proponuje, że obniżenie to może wynikać z indukowanego aktywnością toksyny obniżeniem stężenia wewnątrzkomórkowego tych białek.

Opisane eksperymenty są dobrze zaplanowane i przeprowadzone a uzyskane wyniki bardzo rzetelne i interesujące. Niewątpliwie doktorantka wykazała, że analizowane systemy toksyna-antytoksyna mają wpływ na poziom transkryptów i wewnątrzkomórkowy poziom niektórych białek. Mają też wpływ na poziom białek identyfikowanych w pożywce hodowlanej a więc na sekrecję białek *S. aureus*.

W rozdziale Dyskusja doktorantka w sposób szczegółowy i wnikliwy omawia otrzymane wyniki. W dobry sposób odnosi się do danych literaturowych w kontekście uzyskanych przez siebie wyników. Należy podkreślić, że uzyskane dane nie są łatwe do interpretacji i do pełnego wyjaśnienia wymagają kolejnych eksperymentów. Doktorantka podkreśla kilkakrotnie, że aby opisać mechanizmy warunkujące zmiany poziomu określonych transkryptów i białek wymagane są dalsze badania. Uzyskane przez doktorantkę dane mogą stać się przedmiotem kolejnych projektów wyjaśniających szczegółowe mechanizmy warunkujące aktywność analizowanych systemów-toksyna antytoksyna.

Lektura tekstu nasuwa pytanie czy wiadomo jaki jest natywny poziom analizowanych toksyn i antytoksyn w komórkach *S. aureus* i czy poziom ten jest porównywalny z poziomem uzyskiwanych w eksperymentach, w których prowadzono suplementację z wykorzystaniem plazmidowego DNA?

Czy w normalnych warunkach antytoksyna występuje w dużym nadmiarze względem toksyny? Czy wiadomo jaki czynnik warunkuje stabilność antytoksyny?

Wniosek końcowy

Wyniki badań mgr Kingi Chlebickiej poszerzają naszą wiedzę dotyczącą systemów toksyna-antytoksyna w *S. aureus* i stanowią wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała umiejętność prowadzenia badań skomplikowanych procesów biologicznych z zastosowaniem złożonego warsztatu metod transkryptomicznych i proteomicznych. W eksperymentach stosowała odpowiednie kontrole a uzyskane wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane. Przedstawiona praca została dobrze napisana a wyniki odpowiednio przedstawione. Praca spełnia kryteria stawiane dysertacjom doktorskim, 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 powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr. Kingi Chlebickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

