



Poznań, 3 listopada 2023 r.

Dr hab. Katarzyna Dorota Raczyńska, prof. UAM
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Klementyny Julii Marciniak pt.: „Identyfikacja regulatorowych RNA w metycylinoopornym szczepie *Staphylococcus aureus* (MRSA) z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (Term-seq)”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem pani prof. ICHB PAN, dr hab. Kamilli Grzywacz, a zrealizowana w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Tematyka badań koncentruje się wokół ryboprzełączników, jako mechanizmów regulatorowych wykorzystywanych przez metycylinooporny szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MSRA do nabycia oporności na wankomycynę.

Realizacja badań wymagała od autorki wykonania wielu eksperymentów, rozpoczynając od tych najbardziej podstawowych, wymaganych do scharakteryzowania szczepu MRSA. Tak więc, doktorantka wyznaczyła minimalne stężenie inhibujące wankomycyny oraz wyznaczyła krzywą wzrostu i opisała aktywność metaboliczną i translacyjną bakterii hodowanych w obecności antybiotyku o różnych stężeniach, w porównaniu do warunków kontrolnych. Warto podkreślić, że uzyskane dane korelowały z obserwacjami innych grup badawczych, cytowanych w dyskusji. Z kolei, etap pracy doktorskiej dotyczący identyfikacji ryboprzełączników doktorantka rozpoczęła od poszukiwania optymalnej metody izolacji dobrej jakości RNA; w tym celu przetestowała 10 różnych metod izolacji. Następnie, przygotowała biblioteki cDNA do sekwencjonowania metodą Term-seq, której wybór dobrze uzasadniła. Analiza danych wysokoprzepustowego sekwencjonowania wyłoniła 7 kandydatów na ryboprzełączniki. Doktorantka przedstawiła ich potencjalne struktury drugorzędowe oraz przeprowadziła szeroką charakterystykę genów znajdujących się pod ich kontrolą. Analizy te pozwoliły jej zaproponować kaskadę zdarzeń molekularnych zachodzących w komórkach gronkowca złocistego w trakcie procesu uzyskiwania oporności na wankomycynę. W dalszej części pracy, autorka przeprowadziła weryfikację biochemiczną aktywności wytypowanych ryboprzełączników, wykorzystując wcześniej opracowaną w Zakładzie metodę PTT-quant. Następnie, doktorantka przeanalizowała aktywność regulatorową 4 z nich wykonując ilościowy pomiar transkryptów skróconych metodą ddPCR. Tym samym, potwierdziła możliwość zajścia zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji indukowanej ryboprzełącznikiem w obecności antybiotyku. Niewątpliwie, niniejszą pracę wzbogaciłyby badania podjęte w celu wskazania liganda/metabolitu dla wyselekcjonowanych ryboprzełączników, na to jednak prawdopodobnie nie wystarczyło czasu, z uwagi na ograniczone ramy czasowe przeznaczone na realizację pracy doktorskiej.

Badania doktorantki niewątpliwie mają dużą wartość naukową, a uzyskane wyniki są spójne z doniesieniami literaturowymi innych grup badawczych. Starannie wyselekcjonowane ryboprzełączniki mogą być potencjalnie zaangażowane w regulację specyficznych genów w wyniku stresu antybiotykowego i tym samym służyć bakteriom jako jeden z mechanizmów nabywania oporności na

strona 1 z 4

wankomycynę. W przyszłości mogą więc zostać wykorzystane jako cele w antybiotykoterapii, aby zahamować procesy opornościowe metycylinoopornego szczepu gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA.

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”. Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr Klementyna Marciniak jest współautorką jednej publikacji naukowej, to jest pracy przeglądowej opublikowanej w *Int. J. Mol. Sci.*, oraz przedstawiała na posterze wyniki swoich badań podczas jednej konferencji naukowej. W trakcie studiów doktoranckich udzielała się w popularyzowaniu nauki, czynnie uczestnicząc w wydarzeniach, takich jak: Noc Biologów, Noc Naukowców czy Poznański Festiwal Nauki i Sztuki. W roku 2020, postanowieniem Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej, Pani mgr Klementyna Marciniak otrzymała brązowy krzyż zasługi za działalność naukowo-badawczą.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich. Na początku znajdujemy streszczenie pracy doktorskiej. Następnie, we „Wstępie” zapoznajemy się z charakterystyką szczepu *Staphylococcus aureus* o obniżonej oporności na wankomycynę i różnymi mechanizmami wykorzystywanymi przez te bakterie do nabywania oporności antybiotykowej. W dalszej części opisane są struktury drugorzędowych RNA występujących u bakterii i ich znaczenie w regulacji transkrypcji i ekspresji genów, z uwzględnieniem rybobprzełączników i atenuatorów (tu przydałby się rysunek). W kolejnych częściach zapoznajemy się z „Celem pracy”, potem wymienione są „Materiały” i opisane „Metody”. Rozdział „Wyniki” przepleciony jest „Dyskusją” naukową na temat ich poszczególnych części. To dosyć nietypowa forma przedstawienia wyników i dyskusji, ale uważam, że jest doskonałym rozwiązaniem w przypadku, gdy rozważaniom poddaje się kilka odbiegających tematycznie ścieżek badawczych. Warto podkreślić, że ta część rozprawy jest przygotowana w sposób rzetelny i wyczerpujący, ciekawy i dojrzały naukowo.

Niestety, muszę podkreślić, że cała rozprawa przygotowana jest w sposób nieco niestaranny, pod kątem interpunkcji, języka i stylu. Irytujący brak stosowania przecinków lub stawiania ich w niewłaściwym miejscu, dosyć liczne literówki, powtarzające się wyrazy, potknięcia stylistyczne czy „koszmary” zdaniowe pozostałe prawdopodobnie po kolejnych poprawkach, typu: „Badania, który nowe światło było potwierdzenie skuteczności działania” (str. 37). Takie błędy powinny zostać wyłapane podczas uważnego przeczytania końcowej wersji pracy. Tak dużo błędów nie powinno występować w pracy dyplomowej rangi pracy doktorskiej. Ponadto, nazwy genów niepisane kursywą, stosowanie pewnych skrótów myślowych, np.: „cząsteczki powracają do stanu równowagi sprzed” (str. 23), używanie dziwnych sformułowań, typu: „kolejkowanie dotyczy wielu rybosomów” (str. 34); „mechanizm jest spełniany” zamiast „mechanizm polega na”; „... poskutkowało obserwacją” zamiast „... wykazało” czy „zaobserwowałam”; „rozkład (rG4) jest szczególnie dla poszczególnych gatunków” (str. 34) zamiast „rozkład jest specyficzny”; „motyw łożyczki i pętli” - chyba raczej „trzonu i pętli”. Są też zdania zbyt długie, np.: „Fosforylowana bgIG nie jest zdolna do wiązania rybonukleinowych miejsc antyterminatorowych w powstającym RNA, gdzie wiadomo, że blokuje tworzenie wewnętrznych terminatorów, które inaczej byłyby obecne w operonie, poprzez stabilizację kompetycyjną struktury drugorzędowej” – po przeczytaniu których czytelnik gubi główną myśl. Z innych, drobniejszych potknięć, zauważyłam, między innymi, brak obciążacza RNA w spisie materiałów, brak rozwinięcia skrótu „związek PC1”, natomiast skróty PBP i ORF pojawiają się w tekście kilkakrotnie wcześniej, zanim wreszcie zostaną wyjaśnione. Według wykazu skrótów, RT to odwrotna transkrypcja, natomiast

w Tabeli 6, skrót RT oznacza temperaturę otoczenia (w zasadzie powinna to być temperatura pokojowa, od ang. room temperature). Na Fig. 3, najpierw przedstawiony jest mechanizm dopasowania indukowanego a potem opisana selekcja konformacyjna, w tekście natomiast mechanizmy te opisane są w odwrotnej kolejności. Rozkład kolumn Tabeli 9 mógłby być lepiej rozplanowany, aby poprawnie przenosić wyrazy. Dostyc mylące było dla mnie używanie w tekście „Wyników” i „Dyskusji”, czy Tabeli 11 i 12, naprzemiennie nazwy raz produktu genu, raz nazwy samego genu a jeszcze gdzie indziej nazwy roboczej ryboprzełącznika, podczas gdy nazwy te są zupełnie inne, i trudno je ze sobą skojarzyć. Dla mnie jako nieobytego w tym nazewnictwie czytelnika, takie przeskakiwanie wprowadziło nie lada zamieszanie. Ponadto, mam wrażenie, że lokalizacja ryboprzełącznika DT albo współrzędne genowe w Tabeli 9 są błędnie podane.

Są też poważniejsze błędy. Na stronie 35 znajdujemy informację, że „obecność glukozamino-6-fosforanu wzmacnia aktywność rybozomu znajdującego się regionie 5'UTR genu kodującego właśnie glukozamino-6-fosforan”, kiedy chodzi o gen syntazy glukozamino-6-fosforanu. Glukozamino-6-fosforan to przecież tylko zmodyfikowana cząsteczka glukozy, nie białkowy produkt ekspresji genu. Po ekstrakcji fenol:chloroform, na granicy faz znajduje się warstwa DNA, białek i lipidów, a nie „charakterystyczna warstwa pośrednia”, jak napisała doktorantka.

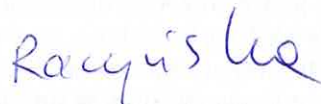
Mimo niedociągnięć językowych, naukowa wartość niniejszej rozprawy pozostaje wysoka i bardzo cenię część, w której mgr Klementyna Marciniak opisuje uzyskane wyniki i dyskusję nad nimi. Nie tylko z uwagi na trafną konstrukcję, ale zwłaszcza na jej jakość. Ta część pracy jest napisana rzetelnie, poparta licznymi publikacjami naukowymi. Autorka analizuje każdy wynik pod różnym kątem. Wnioski są sformułowane poprawnie, a uzyskane wyniki stanowią wyczerpujący materiał do dalszych badań, których zwieńczeniem będzie wartościowa publikacja. Właściwie nie mam do części większych uwag krytycznych, poza kilkoma spostrzeżeniami:

Mam wrażenie, że niektóre dane podane na rysunku 12, są źle oszacowane, logarymiczna faza wzrostu dla hodowli bakterii *S. aureus* po podaniu 1,5 mg/L wankomycyny zaczyna się według mnie wcześniej, niż po 746 min. Nie do końca zgadzam się również z interpretacją wyników eksperymentu analizy polisomów. Czy doktorantka nie ma wrażenia, że frakcja polisomów jest wyższa dla hodowli po podaniu 2 mg/L wankomycyny w porównaniu do innych prób (Rys. 14)? Mam również wątpliwości co do stwierdzenia ze strony 73, dotyczącego Rys. 15: „Obserwowalną tendencją jest również wzrost udziału rybosomów 100S w stosunku do pozostałych frakcji w danym warunku po wprowadzeniu do hodowli wankomycyny”. Czy nie powinno być: „Obserwowalną tendencją jest również wzrost udziału rybosomów 100S w hodowli po podaniu 0,5 mg/L, 1 mg/L i 1,5 mg/L wankomycyny w stosunku do frakcji kontrolnej”? Z kolei, wyjaśnienie niskiej wartości dla poziomu aktywności translacyjnej w hodowlach z wankomycyną o stężeniu 0,5 mg/L i 2 mg/L spowolnieniem metabolicznym niezbędnym do wprowadzenia zmian adaptacyjnych, wydaje mi się zasadne także i dla pozostałych hodowli, gdzie również obserwujemy spadek w porównaniu do hodowli kontrolnej 0 mg/L (Rys. 16). Użyte w tej części sformułowanie „Przy stężeniu wankomycyny 0,5 mg/L jako pierwotnej reakcji na pojawienia się czynnika stresowego” jest moim zdaniem nieuprawnione, bo w każdej innej hodowli czynnik stresowy był „pierwotny”, czy to była wankomycyna o stężeniu 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L czy 2 mg/L. Przecież doktorantka nie podnosiła stopniowo stężenia wankomycyny w jednej hodowli, tylko do każdej podawała jednorazowo wankomycynę o różnym stężeniu. Dlaczego więc komórka miałaby reagować tylko na najniższe stężenie i tylko na najwyższe, a na pośrednie już nie?

W trakcie czytania nasunęły mi się również dwie inne kwestie i chciałabym poznać opinie doktorantki na ich temat, mianowicie:

1. Na rysunkach 21-33 podano struktury drugorzędowe wytypowanych ryboprzełączników. Czy są one zgodne z regułami struktur przypisanymi ryboprzełącznikom? Jakie to reguły? Na stronie 26 znalazłam informację tylko o tym, że wymagana jest obecność ciągu nukleotydów uracylu na końcu 3' wygenerowanego motywu. Ponadto, przyjmując, że ze względu na ich funkcję, sekwencje potencjalnych ryboprzełączników powinny tworzyć dwa układy, czy jest możliwe wygenerowanie drugiej struktury bez znajomości liganda? Czy można o niej wnioskować na podstawie kryterium występowania ortologów, o którym też autorka wspomina? Przy okazji, czy autorka znalazła ortologi dla wytypowanych przez nią ryboprzełączników?
2. W pracy zabrakło mi trochę perspektyw badawczych. Chciałabym się dowiedzieć, co zdaniem doktorantki, mogłoby stanowić ligand/metabolit dla wyselekcjonowanych przez nią ryboprzełączników? Jakie metody badawcze zaproponowałaby, aby taki ligand znaleźć a potem potwierdzić swoje predykcje? Jakie metody badawcze zaproponowałaby, aby opisać strukturę drugorzędową ryboprzełączników po związaniu liganda?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Marty Klementyny Julii Marciniak uważam za wartościową naukowo i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Badania naukowe doktorantki niewątpliwie dostarczają nowej wiedzy na temat ryboprzełączników, a ściślej metod ich identyfikacji, weryfikacji i mechanizmu działania, co czyni je potencjalnymi celami molekularnymi w alternatywnych terapiach przeciwdrobnoustrojowych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Klementyny Julii Marciniak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Katarzyna Dorota Raczyńska