



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 70 01
e-mail: rektorat@up.poznan.pl

WYDZIAŁ NAUK O
ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU
Katedra Technologii Żywności
Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy

Poznań, 6 listopada 2023 r.

Prof. dr hab. Agnieszka Piotrowska-Cyplik
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Pracownia Fermentacji i Biosyntezy
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
tel. (61) 848-72-84
e-mail: agnieszka.piotrowska@up.poznan.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Klementyny Marciniak

pt.: „Identyfikacja regulatorowych RNA w metycylinoopornym szczepie

***Staphylococcus aureus* (MRSA) z wykorzystaniem wysokoprzepustowego
sekwencjonowania (Term-seq)”**

zrealizowanej w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN pod kierunkiem dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN w ramach projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest pismo z dnia 2 października 2023 r. wystosowane przez Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN dr Joannę Banasiak.

I. Ocena tematyki pracy

Szacuje się, że w przeważającej liczbie państw wysokorozwiniętych produkcja zwierzęca pochłania większość krajowej konsumpcji antybiotyków, mówi się o 80%, z czego znaczną część stanowią preparaty istotne z medycznego punktu widzenia dla człowieka. Obecność ich pozostałości w żywności oraz ich rozprzestrzenianie się w środowisku w wyniku procesów produkcyjnych oraz hodowli zwierzęcej, niesie za sobą negatywne następstwa zdrowotne, a pośrednio także ekonomiczne dla człowieka.

Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy ważnego problemu poszukiwania nowych metod i rozwiązań leżących u podstaw poznania mechanizmów funkcjonowania komórki, odpowiedzialnych za ujawnianie się antybiotykoodporności. Mechanizmy te, w konsekwencji doprowadzić mogą do opracowania alternatywnych terapii antybiotykowych. Zakażenia będące wynikiem zainfekowania przez odporne na antybiotyki bakterie stanowią na chwilę obecną jedno z najniebezpieczniejszych zagrożeń dla zdrowia, a zatem ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Opublikowana w ubiegłym roku praca w „The Lancet Infectious Diseases”, pokazała niepokojące dane. W 2019r. z powodu zakażeń powiązanych z wieloopornymi szczepami zmarło na świecie około 5 mln osób, z czego 1,27 mln z powodu zakażeń wywołanych przez bakterie odporne na wszystkie dostępne antybiotyki. Zarówno WHO, jak i Komisja Europejska uznały walkę z rozprzestrzeniającą się antybiotykoodpornością za działania priorytetowe. Znajduje się ona na liście 10 najważniejszych zadań WHO, natomiast Komisja Europejska umieściła problem antybiotykoodporności wśród trzech najważniejszych do rozwiązania problemów. W ostatnich latach obie te organizacje postrzegały zjawisko antybiotykoodporności szerzej, umieszczając je w strategii „Jedno Zdrowie”, czyli koncepcji zwracającej uwagę na współzależności pomiędzy zdrowiem ludzi, zwierząt i stanem środowiska naturalnego.

Praca doktorska **mgr inż. Klementyny Marciniak** doskonale wpisuje się w najnowsze trendy w obszarze stosowania alternatywnych metod leczenia i modyfikacji strukturalnie już istniejących związków bakteriobójczych zamiast projektowania nowych antybiotyków. Tym samym ukazuje potrzebę odkrywania i rozpoznawania nowych mechanizmów bakteryjnych w antybiotykoterapii. Mechanizmy regulatorowe RNA jako złożona sieć powiązań umożliwia projektowanie wielu wariantów skutecznej inhibicji ekspresji genów warunkujących lekooporność. Potencjał ryboprzełączników jako nowych rozwiązań w antybiotykoterapii jest szczególnie ze względu na fakt, udokumentowanego kontrolowania genów związanych z opornością oraz możliwością indukcji niskocząsteczkowymi metabolitami. W przedstawionej pracy zidentyfikowanych zostało siedem potencjalnych



ryboprzełączników, których aktywność obserwowalna jest w trakcie adaptacji komórki do stresu wywołanego działaniem wankomycyny.

II. Ocena formalna

Rozprawa nie ma typowego charakteru dla dysertacji doktorskich, z którymi do tej pory miałam okazję się zapoznać i stanowi obszerne opracowanie obejmujące 148 stron, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Rozdział 2, zatytułowany „Wstęp”, jest 36-stronicowym przeglądem literatury podzielonym na trzy części. Podrozdział 2.1. dotyczy charakterystyki *Staphylococcus aureus* MRSA, podr. 2.2. opisuje strukturę drugorzędową RNA w kontroli ekspresji genów u bakterii, a podr. 2.3. przedstawia ryboprzełączniki jako cele w antybiotykoterapii.

Rozdział 3, zatytułowany „Cel i uzasadnienia podjętej tematyki pracy”. Pierwsze zdanie tego rozdziału cyt.: „*Za cel pracy obrałam dwa szczegółowe zadania badawcze*” w mojej ocenie wymaga przeredagowania na „Cel pracy osiągnięto poprzez realizację dwóch szczegółowych zadań badawczych:....”, a cel powinien zostać wyodrębniony i wyraźnie wskazany.

Autorka, może nie bezpośrednio, ale sformułowała **cel szczegółowy** pracy w rozdziale 3 zatytułowanym „Cel i uzasadnienie podjętej tematyki pracy”. Jest to ostatnie zdanie, na str. 40 cyt.: „...**Ocena, które elementy regulatorowe w komórce stanowią potencjalne cele dla alternatywnych terapii antybiotykowych**” oraz wcześniej na str. 38 – ostatni akapit, również nie bezpośrednio, ale wskazała **cel ogólny** pracy a mianowicie cyt.: „...**Poznanie mechanizmów leżących u podstaw ujawniania się antybiooporności.**”

W pracy brakuje wyraźnie sformułowanej hipotezy bądź hipotez badawczych, co Autorka częściowo rekompensuje krótkim, ostatnim akapitem w rozdziale trzecim.

Rozdział 4, omawia zastosowaną metodykę.

Rozdział 5, szczegółowo opisuje wyniki uzyskane w wyniku prac eksperymentalnych oraz przedstawia dyskusję do części doświadczalnej. Składa się aż z 61 stron.

Rozdział 6 to podsumowanie bez wyodrębnionych wniosków,

Rozdział 7, zawiera wykaz skrótów,

Rozdział 8, to spis tabel, rysunków i równań,

Ponadto w pracy zawarte są referencje zawierające 187 pozycji wyłącznie anglojęzycznych i załączony na końcu dorobek naukowy. Literatura naukowa z ostatnich 5-7 lat stanowi około 21 % (40 poz.).

Podsumowując ogólną charakterystykę pracy, stwierdzam że oceniana praca ma charakter doświadczalny i mieści się w rozpatrywanej dyscyplinie.

Ocena merytoryczna pracy

W omawianej rozprawie Autorka przedstawiła dwa szczegółowe zadania badawcze. Po pierwsze scharakteryzowanie indukowanych w odpowiedzi na stres antybiotykowy zmian w aktywności transkrypcyjnej, translacyjnej oraz regulatorowej opornego na metycylinę szczepu gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA. Drugim wyszczególnionym zadaniem badawczym była identyfikacja kluczowych komponentów sieci regulatorowej RNA, takich jak ryboprzełączniki, o wysokim potencjale terapeutycznym w kontekście antybiotykoterapii MRSA.

Recenzowana praca jest ciekawą i skuteczną próbą wglądu w mechanizmy regulatorowe zależne od RNA poprzez identyfikację kluczowych komponentów sieci regulatorowej RNA - ryboprzełączników u *Staphylococcus aureus* (MRSA) w trakcie stresu antybiotykowego wankomycyną. W tym celu Autorka wyznaczyła stężenie wankomycyny, przy którym zachodzą zauważalne procesy adaptacyjne, a następnie wykonała sekwencjonowanie nowej generacji metodą Term-seq. Sekwencjonowanie to ma swoje szczególne uzasadnienie w tym przypadku, z punktu widzenia analizy mechanizmów regulatorowych opartych o zdarzenia terminacji transkrypcji. Dzięki etapowi ligacji adaptorów do wszystkich naturalnych końców 3' mRNA możliwe jest oznaczenie transkryptów pełnej długości oraz skróconych, powstałych w wyniku działania ryboprzełączników. Doktorantka przeprowadziła analizę porównawczą uzyskanego obrazu transkryptomu pochodzącego z hodowli kontrolnej MRSA oraz z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Następnie Autorka wyselekcjonowała siedem kandydatów na ryboprzełączniki na podstawie różnic długości transkryptów mapujących do regionów 5'UTR. Dla każdego spośród wybranych regulatorów



dokonała predykcji struktury drugorzędowej dla potwierdzenia istotności obserwacji oraz przeanalizowała funkcję genów znajdujących się pod ich kontrolą. Doktorantka zidentyfikowała aktywność potencjalnych ryboprzełączników, w trakcie stresu adaptacyjnego do wankomycyny, modulujących ekspresją: transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00167), cukrowego transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00175), podjednostki D kompleksu antyporterowego (SAOUHSC_00886), kinazy homoseryny (SAOUHSC_01322), komponentu pierwszego syntazy kwasu antranilowego (SAOUHSC_01366), dwufunkcyjnej autolizyny (SAOUHSC_02023) oraz transferazy dimetyloadenozynowej (SAOUHSC_00464). Autorka wskazała, że zgodnie z najnowszą wiedzą wszystkie wskazane geny uczestniczą w powstawaniu fenotypu wykazującego obniżoną wrażliwość na wankomycynę.

W drugim etapie prac Autorka przeprowadziła weryfikację biochemiczną dla wskazanych danych przez zastosowanie metody PTT-quant. Podejście to jest skierowane na analizę aktywności transkrypcyjnej genów potencjalnie regulowanych przez ryboprzełączniki, dzięki umożliwieniu bezwzględnego określenia stężeń transkryptów skróconych, jak i pełnej długości. Po zastosowaniu metody PTT-quant, dla czterech spośród siedmiu wyłonionych kandydatów na ryboprzełączniki Doktorantka potwierdziła działanie ryboprzełączników w warunkach stresu wankomycyną. Współczynnik indukcji potencjalnych ryboprzełączników znajdujących się w 5'UTR mRNA stanowił kolejno: 2,01 dla transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00167); 1,09 dla podjednostki D kompleksu antyporterowego (SAOUHSC_00886); 3,18 dla kinazy homoseryny (SAOUHSC_01322) oraz 2,06 dla transferazy dimetyloadenozynowej (SAOUHSC_00464). Przeprowadzone badania potwierdzają zasadność podjęcia dalszych działań mających na celu wykorzystanie wskazanych mechanizmów regulatorowych jako nowych dróg w kierunku opracowywania alternatywnych terapii antybiotykowych.

Szkoda, że Autorka rozprawy nie zamieściła obszerniejszego podsumowania i nie sformułowała wniosków z przeprowadzonych badań, które mogłyby podkreślić elementy nowości naukowej i perspektywę wykorzystania uzyskanych wyników.

Liczę na ich zaprezentowanie podczas publicznej obrony, gdyż w podsumowaniu można wyodrębnić od czterech do sześciu wniosków, w zależności od przyjętego poziomu uszczegółowienia.

Silną stroną pracy jest wnikliwa dyskusja wyników obejmująca próby interpretacji przyczynowo-skutkowej oraz nawiązanie do danych literaturowych niestety niekiedy dość odległych czasowo od 13 do 28 lat a nawet starszych. Pozycje z ostatnich 5 do 7 lat stanowią zaledwie 21%. Mając na uwadze dużą liczbę prac naukowych zacytowanych z podjętego zakresu badawczego, należy stwierdzić jednak, że dobór bibliografii jest odpowiedni i stanowi dobrą podstawę dla dokonania wszechstronnego przeglądu literaturowego. Doktorantka zastosowała nowoczesne techniki analityczne w postaci m.in. sekwencjonowania Term-seq, co świadczy o Jej bogatym warsztacie analitycznym.

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. **Klementyny Marciniak** jest dobra. Praca obejmuje szeroki zakres wykonanych doświadczeń i zawiera dużą ilość materiału faktograficznego. Wprawdzie napisana jest w sposób niekonwencjonalny, ale za to przemyślany. Należy podkreślić, że praca wykonana jest poprawnie pod względem formalnym, stylistycznym i językowym oraz nie budzi zastrzeżeń natury naukowej. Na uwagę zasługuje styl języka polskiego. Autorka lubi ubogacać język często zaskakującymi zamiennikami, które nie goszczą na co dzień w nomenklaturze naukowej z prezentowanego obszaru nauki jak np.: sekwertować czyli związywać, wyłapywać substancje w środowisku przez inną substancję, czy ubikwistycznymi – czytaj o małych wymaganiach pod względem warunków naturalnych. Nie jest to zarzut lecz jedynie spostrzeżenie, że oprócz zawłości badań molekularnych Autorkę interesują zawłości lingwistyczne.

Sama redakcja pracy, być może z uwagi na krótki czas przygotowania manuskryptu wymaga dopracowania.

Lektura kolejnych rozdziałów rozprawy doktorskiej mgr inż. Klementyny Marciniak obok pozytywnej oceny nasuwa następujące uwagi:

Autorka w pracy popełniła dość dużo błędów stylistycznych, edytorskich np. nie wyeliminowała dość licznych powtórzeń np. na str. 5 – „spis treści”, str. 15 –



użycie 2x „opornych”, błędów interpunkcyjnych – np. na str. 17. Często w sposób nieuzasadniony używa wielkich liter np. na str.7, 126 itd. Na str. 8 - brak orzeczenia w zdaniu. Niefortunnie są zastosowane niektóre spersonalizowane określenia jak np. „geny uwikłane są”; str. 29 ostatni akapit: cyt.:” Analogiczny model działania do ryboprzełącznikami dzielą atenuatory.”? - niepoprawny styl.

Zbędny moim zdaniem na poziomie rozprawy naukowej na stopień doktora jest wykaz stosowanych skrótów, które można napisać w pełnej nazwie przy pierwszym przywołaniu w tekście. Zbędne i nie wnoszące żadnej wartości dodanej są zdjęcia str. 64 i 65 (rys. 9, 10 i 11).

Tabela nr 6 niewłaściwie podpisana. Słabej jakości są zdjęcia rozdziału elektroforetycznego (rys.7 i 8).

Opis tabel niejednorodny - raz na górze tabeli raz pod tabelami np. tab.1, 2, 7 i 8 itd. str. 21, 41, 66 i 67.

W rozdz. 4 Materiały i metody. Brak informacji w jakich warunkach pod względem bezpieczeństwa mikrobiologicznego prowadzone były prace laboratoryjne z hodowlami *Staphylococcus aureus* (MRSA). Jaki poziom bezpieczeństwa reprezentuje laboratorium, w którym prowadzono badania z lekoopornym szczepem? Brakuje informacji z jakiej kolekcji pochodzi badany szczep. W rozdziale czwartym niepotrzebnie jest dodany i wyodrębniony podrozdział „aparatura”. Przedstawianie wykazu użytych odczynników uważam za zbędne w dysertacji doktorskiej.

W podrozdz. 4.5.1 Warunki hodowli *Staphylococcus aureus* – pierwsze zdanie na str. 45 jest do przeredagowania na „hodowle prowadzono w następujących warunkach...”

Skład podłoża str. 48. *Skład podłoża stałego **do wyznania MIC** (1 l): Bulion Muellera-Hintona (MHA) (1 l): kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g), ekstrakt wołowy (2 g), skrobia (1,5 g), agar (10 g), wankomycyna* przeredagować na: Podłoże Muellera-Hintona (MHA stanowił bulion o następującym składzie:

Pkt. 4.5.5 podpkt. Hodowla płynna „Po tym czasie przeniesiono pojedynczą kolonię do pożywki płynnej (MHA) o objętości 20 ml zawierającej odpowiednie stężenie wankomycyny.” Nie powinno się zaszczepiać bezpośrednio hodowli płynnych z wankomycyną koloniami wyrosłymi na podłożach redukcyjnych, gdyż zastosowane

w ten sposób inokulum dla każdego przypadku jest inne. Mikroorganizmy powinny zostać namnożone w hodowli płynnej i następnie zostać użyte jako identyczne inokulum do zaszczerpienia poszczególnych hodowli z wankomycyną.

W podrozdz. 4.5.6 Wyznaczenie krzywej wzrostu Staphylococcus aureus MRSA.

Zdanie: "Wyznaczanie krzywej wzrostu rozpoczęto od prowadzenia hodowli bakteryjnej jak w punkcie 4.5.1." - powinno zostać przeredagowane.

Zdanie na str 57: "W przypadku lekoopornego szczepu gronkowca złocistego jest to szczególnie wymagające wyzwanie ze względu na specyfikę morfologiczną budowy". Proszę wyjaśnić, co Autorka rozumie przez specyfikę morfologiczną budowy.

Tabela 6 na str. 60 - brak statystyki, wszystko w jednym powtórzeniu. Czy do wszystkich wariantów zastosowano tą samą hodowlę pod względem liczby komórek.?

Na str. 69 Zadanie: "Z analizy statystycznej otrzymanych wartości przeżywalności wynika, że różnice w przeżywalności hodowli *S. aureus* MRSA w zróżnicowanym stężeniu antybiotyku wankomycyny w przedziale 0 – 2 mg/l nie są istotne statystycznie. W pracy **brakuje informacji o zastosowanej metodzie statystycznej**."

Czas trwania hodowli dla wyznaczenia minimalnego stężenia inhibującego dla *S. aureus* MRSA w hodowli z wankomycyną powinien zostać podany precyzyjnie w godzinach, a nie w przybliżeniu stosując określenie "po całonocnej inkubacji". Dlaczego Autorka zróżnicowała stężenia wankomycyny zastosowane w posiewach redukcyjnych dla hodowli na podłożach stałych i dla hodowli płynnych. W jakim celu zastosowano aż 14 różnych stężeń w hodowlach płynnych i 16 stężeń w hodowlach stałych? Stężenie wankomycyny 0,0 mg/l dla hodowli na podłożach stałych powinno zostać usunięte i zastąpione opisem próbka kontrolna bez dodatku antybiotyku. Dlaczego nie uwzględniono hodowli płynnej bez dodatku antybiotyku?

Korekty/uzupełnienia wymaga zapis na str. 54 „.....przy pomocy elektroforezy kapilarnej na aparacie Agilent 2100 Bioanalyzer.”

Korekty wymaga forma prezentacji referencji. W spisie literatury Autorka raz podaje skrót nazwy czasopisma jak np. przy pozycjach literaturowych: 26, 29, 51, 169, 173, a w zdecydowanej większości przypadków, wymienionych referencji literaturowych, podaje pełne nazwy cytowanych czasopism. Data wydania źródła



literaturowego raz jest na końcu jak np. poz. 164, 171, 172, 181, a innym razem przed numerami stron wymienionymi na końcu jak np. w poz. 162, 169, 170 itp.

Rozdział podsumowanie uważam za potrzebny jednak nie wyczerpuje on w pełni swego zadania. Autorka na wstępie wskazuje największe dokonania swoich badań, które notabene znakomicie można byłoby ująć w sześciu wnioskach. Następnie przechodzi w ostatnim akapicie podsumowania do próby przedyskutowania swoich osiągnięć badawczych na tle dotychczasowej wiedzy literaturowej. W moim odczuciu fragment ten jest napisany powierzchownie i w sposób mało pogłębiony, dlatego sugerowałabym jego rozbudowanie o szerszą dyskusję w celu chociażby weryfikacji potencjału terapeutycznego siedmiu zidentyfikowanych ryboprzelączników w odniesieniu do danych literaturowych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dyscyplinie nauki biologiczne. Jej przedmiot stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe świadczące o doskonałym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym mgr inż. Klementyny Marciniak. Rzeczowe określenie problemu badawczego, sprecyzowanie metodologii badań oraz doskonała ich organizacja pozwoliła na uzyskanie wielu oryginalnych wyników naukowych zarówno o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym. Rozprawa opiera się na dobrze dobranym materiale źródłowym związanym z tematyką pracy. **Biorąc pod uwagę wartość naukową i korzyści płynące z ich wykorzystania, a także szeroki zakres wykonanych eksperymentów i umiejętności logicznej interpretacji wyników stwierdzam, że 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 mgr inż. Klementyny Marciniak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Agnieszka Piotrowska-Cyplik