



Poznań, 14.11.2023.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Klementyny Julii Marciniak

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

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN
w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi monografię naukową. Temat pracy związany jest z poszukiwaniem nowych sposobów walki z bakteriami opornymi na antybiotyki. W swojej pracy, Doktorantka skupiła się na mechanizmach regulatorowych RNA – ryboprzełącznikach i zbadała aktywność potencjalnych ryboprzełączników modulujących ekspresję w trakcie stresu adaptacyjnego na wankomycynę u bakterii *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Rozprawa obejmuje Spis treści, Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki i dyskusję oraz Podsumowanie. W skład rozprawy wchodzi również: wykaz skrótów, spis tabel, rysunków i równań, referencje oraz dorobek naukowy. Praca zawiera 149 stron, 13 tabel, 41 rysunków i 2 równania. W pracy zacytowano 187 artykułów.

We wstępie Doktorantka przedstawiła charakterystykę bakterii *S. aureus*, w szczególności szczepu Mu50, czyli gronkowca MRSA o obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Szczegółowo opisała również genetykę oporności *S. aureus* na antybiotyki. W dalszej części, Doktorantka przedstawiła strukturę drugorzędową RNA, dynamikę tej struktury, a także zmiany struktury drugorzędowej RNA w regulacji transkrypcji i translacji. Osobny podrozdział stanowi opis ryboprzełączników jako regulatorów genów i potencjalnych celów w antybiotykoterapii.

Cel rozprawy został podzielony na dwa zadania badawcze. Pierwszym było zbadanie zmian w aktywności transkrypcyjnej, translacyjnej oraz regulatorowej szczepu *S. aureus* MRSA w odpowiedzi na stres antybiotykowy. Drugim zaś było zidentyfikowanie ryboprzełączników, o wysokim potencjale terapeutycznym w kontekście antybiotykoterapii MRSA.

Doktorantka wykorzystwała w pracy liczne metody badawcze. Wyznaczała minimalne stężenia hamujące (MIC), krzywą wzrostu oraz aktywność metaboliczną dla *S. aureus* MRSA w hodowli z wankomycyną. Z hodowli *S. aureus*, izolowała całkowite RNA, a następnie frakcjonowała rybosomy w gradiencie sacharozy. Kolejnym etapem badań było przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania Term-seq i weryfikacja biochemiczna z zastosowaniem metody PTT-quant.

W wynikach, na podstawie różnic długości transkryptów mapujących do regionów 5'UTR, Doktorantka wyselekcjonowała siedmiu kandydatów na ryboprzełączniki. W trakcie stresu adaptacyjnego do wankomycyny zidentyfikowała aktywność potencjalnych ryboprzełączników dla genów transportera ABC, białka wiążącego ATP, cukrowego transportera ABC, białka wiążącego ATP, podjednostki D kompleksu antyporterowego, kinazy homoseryny, komponentu pierwszego syntazy kwasu antranilowego, dwufunkcyjnej autolizyny i transferazy dimetyloadenozynowej. Po weryfikacji biochemicznej metodą PTT-quant, działanie ryboprzełącznika potwierdzono dla czterech kandydatów w warunkach stresu na wankomycynę. Współczynnik indukcji potencjalnych ryboprzełączników wynosił odpowiednio: 2,01 dla transportera ABC, białka wiążącego ATP; 1,09 dla podjednostki D kompleksu antyporterowego; 3,18 dla kinazy homoseryny i 2,06 dla transferazy dimetyloadenozynowej. Doktorantka wykazała, że powyższe ryboprzełączniki mogą być celami molekularnymi w terapii antybiotykowej.

Pomimo interesujących wyników, w rozprawie pojawiły się aspekty wymagające korekty lub wyjaśnienia:

1. W pracy zbadano tylko jeden szczep MRSA. Dlaczego nie zbadano jednocześnie szczepu kontrolnego np. nie-MRSA? Dlaczego nie zbadano szczepów klinicznych, które mogą być bardziej zróżnicowane genetycznie i mogą cechować się inną aktywnością ryboprzełączników?

2. Oporność na metycylinę u *S. aureus* może nie być związana z mutacją w genie *mecA*, np. u szczepów BORSA, lub może zależeć od modyfikacji natywnego białka PBP, np. u szczepów MODSA. Oporność ta może być też powiązana z mutacją w genie *mecC*. Czy przy projektowaniu badań, szczepy te były brane pod uwagę? Czy w tych szczepach celami molekularnymi mogą być inne ryboprzełączniki, niż wykazane w pracy?
3. W metodyce brakuje informacji, gdzie i na jakim sprzęcie wykonano sekwencjonowanie Term-seq. Skromna informacja pojawia się dopiero w wynikach [5.2.1.].
4. Czy podłoża do hodowli wykonywano samodzielnie, czy też skład pożywek dotyczy kupnych produktów? Jeśli wykonywano samodzielnie, to brakuje metodyki.
5. Doktorantka wykonała badania MIC metodą hodowli z dodatkiem odpowiednich stężeń wankomycyny, jak domyślam się, na podłożach samodzielnie wykonywanych. Niestety, badanie takie obarczone jest dużym błędem, na co wpływ mają m.in. grubość podłoża, gęstość podłoża, nierównomierne stężenie wankomycyny w podłożu. Badanie to powinno zostać wykonane na kupnych standaryzowanych podłożach z użyciem gradientu wankomycyny w postaci E-testu.
6. W badaniach określono MIC dla wankomycyny na poziomie 2 mg/l (wrażliwy) w bulionie i 26 mg/l (oporny) w hodowli na podłożu stałym. Skąd taka różnica?
7. W Wynikach i Dyskusji, powtórzeniu ulegają niektóre opisy przedstawione już w Metodach np. etapy przygotowywania bibliotek cDNA.
8. Wyniki są pomieszane, np. w rozdziale 5.1. dotyczącym charakterystyki MRSA, pojawia się opis izolacji RNA, zamiast przedstawienia konkretnych wyników badań szczepu, w tym MIC czy krzywej wzrostu.
9. Nie widzę sensu przedstawiania w pracy historii zmian kryteriów oporności *S. aureus* na wankomycynę (Tabela 7). Obecnie zgodnie z wytycznymi EUCAST, szczep Mu50 klasyfikowany jest jako VRSA i dotyczy to wszystkich szczepów z MIC dla wankomycyny >2 mg/l.
10. Rysunek 17 powinien znaleźć się w Metodyce, a nie w Wynikach.

Podsumowując, rozprawa doktorska stanowi wartościowy dorobek naukowy. Może się ona przyczynić do opracowania nowych metod zwalczania patogenów człowieka. Doktorantka zrealizowała zaplanowany cel, wykazała przygotowanie merytoryczne i opanowała metodologię badawczą. Jednak, jak przedstawiłem wyżej, praca wymaga niewielkich poprawek lub wyjaśnień dla recenzenta.

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 Klementyny Julii Marciniak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku,

