

dr hab. Katarzyna Potrykus
Katedra Biologii Molekularnej
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 14.04.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Michała Bukowskiego
„Charakterystyka hipotetycznego operonu *saoABC* potencjalnie kodującego nieznaną
system regulacji transkrypcji genów u *Staphylococcus aureus*”

Mimo szerokiej dostępności antybiotyków, a może właśnie przez nią, zakażenia powodowane przez szczepy gronkowca złocistego stanowią bardzo istotny problem, szczególnie jeśli chodzi o zakażenia wewnątrzszpitalne. Dlatego, zakażenia spowodowane *Staphylococcus aureus* są nie tylko przyczyną zatruc pokarmowych, ale mogą też prowadzić do zakażeń układowych. Przykładem jest posocznica gronkowcowa, zakażenia układu moczowego czy też kostnego. Szczególnym wyzwaniem są tzw. szczepy MRSA (metycylicyno-oporne szczepy *Staphylococcus aureus*) i VRSA (wankomycyno-oporne *S. aureus*), które wykształciły oporność na jedne z najbardziej do niedawna efektywnych antybiotyków przeciw gronkowcowych. Istnieje więc pilna potrzeba podjęcia nowych strategii walki z tymi mikroorganizmami. Aby tego dokonać, potrzebne jest jednak lepsze zrozumienie systemów regulujących wirulencję *S. aureus*, w tym systemów biorących udział w oddziaływaniach gospodarz-patogen. Szczególnie istotne byłoby dokładniejsze poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów.

Powyższym zagadnieniem zajął się Pan mgr Bukowski, który w swojej rozprawie doktorskiej postanowił scharakteryzować operon *saoABC* zidentyfikowany w szczepie *S. aureus*. Przedstawione badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pana Profesora Adama Dubina i Pana doktora Benedykta Władyki. W

wymienionej jednostce od wielu lat z powodzeniem prowadzone są badania nad biochemią, patogenezą i regulacją ekspresji genów *Staphylococcus aureus*, zatem tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta doskonale wpisuje się w zakres zainteresowań i kompetencji Zespołu, w którym praca została wykonana.

W swojej pracy doktorskiej, Pan magister Michał Bukowski zidentyfikował u *S. aureus* hipotetyczny operon *saoABC*, a następnie podjął badania mające na celu zidentyfikowanie mechanizmów regulacji oraz funkcję jego poszczególnych elementów w komórce bakteryjnej. W tym celu wykorzystany został cały szereg technik badawczych, takich jak analiza bioinformatyczna, metody inżynierii genetycznej, izolacja białka SaoC, Real-Time PCR, analiza mikroskopowa, analiza proteomiczna, badanie wirulencji w modelu zarodka kurzego, oraz testy na antybiotykooporność mutantów typu *knockout*. Świadczy to o kompleksowym podejściu Doktoranta do postawionego zagadnienia i próbach otrzymania jak największej ilości informacji na temat nieznanych dotąd genów i produktów przez nie kodowanych.

Za główne osiągnięcia pracy doktorskiej Pana magistra Michała Bukowskiego uważam:

- identyfikację nieznanego dotąd operonu *saoABC*, który występuje tylko u gronkowców (Pan Bukowski wskazał na występowanie tego operonu u większości gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, dzięki czemu można było opracować metodę ich identyfikacji poprzez PCR-RFLP),
- opracowanie metody izolacji białka SaoC, dzięki czemu Doktorant mógł przeprowadzić wstępną charakterystykę biochemiczną SaoC, w tym wstępnie stwierdzić wiązanie tego białka do DNA,
- zbadanie wpływu warunków środowiskowych na ekspresję genów hipotetycznego operonu *saoABC*, co wykazało różnice między ekspresją poszczególnych genów operonu w warunkach obniżonego pH, podczas głodu aminokwasowego czy węglowego (to zdaje się sugerować, iż regulacja ekspresji genów operonu *saoABC* jest dosyć złożona),
- skonstruowanie mutantu *saoC* typu *knockout*, co stanowi doskonale narzędzie aby w przyszłości przeprowadzić szczegółową analizę transkryptomyczną szczepów pozbawionych tego genu (do tej pory z zastosowaniem mutantu *saoC* Doktorant przeprowadził badania wpływu SaoC na wirulencję, a także przeprowadził wstępną analizę proteomiczną).

Poniżej przedstawiam uwagi krytyczne odnoszące się do części eksperymentalnej pracy oraz pytania, na które oczekuję od Doktoranta udzielenia odpowiedzi podczas obrony pracy doktorskiej:

1. Na podstawie przedstawionych wyników nie mogę zgodzić się, iż czynnik SaoC jest alternatywną podjednostką sigma. Przytoczone argumenty (wiązananie SaoC do DNA, dwa motywy HTH, nietypowa migracja w żelu SDS-PAGE, peryferyjna lokalizacja w obrębie komórki, wysoce konserwatywny element poprzedzający gen *saoC*, spadek ekspresji *saoC* w warunkach głodu węglowego) uważam za niewystarczające. Świadczą one jedynie o tym, iż SaoC może być czynnikiem wiążącym DNA, być może także czynnikiem transkrypcyjnym, ale niekoniecznie bezpośrednio regulującym ekspresję genu *saoC*. Podstawowym doświadczeniem jakie należałoby przeprowadzić jest chociażby zbadanie oddziaływania SaoC z rdzeniem polimerazy RNA, a także zbadanie wiązania tego białka do DNA w obecności polimerazy.

2. Wielce zastanawiające jest, że czynnik SaoC jest wysoce konserwowany u gronkowców, nie występuje u innych rodzajów bakterii, a jednak białko to wiąże się do DNA, które pochodzi z *E. coli*. Co więcej, oddziaływania te wydają się być bardzo silne ponieważ kompleksy SaoC-DNA izolowano poprzez ekstrakcję 1M NaCl. Jest to kolejny argument świadczący przeciwko hipotezie, iż SaoC stanowi ekstracytoplazmatyczny czynnik sigma. Po pierwsze, oddziaływania te wymagałyby obecności rdzenia polimerazy RNA (Rys. 11 przedstawiający żel SDS-PAGE przygotowany z preparatu białkowego SaoC wskazuje na bardzo niskie zanieczyszczenie preparatu innymi białkami), a po drugie jest mało prawdopodobne, aby oddziaływania [alternatywna podjednostka sigma - DNA] lub [alternatywna podjednostka sigma - rdzeń polimerazy RNA-DNA] były na tyle silne, żeby przetrwać w tak wysokim stężeniu soli. Dla porównania, w warunkach transkrypcji *in vitro* kompleksy [holoenzym polimerazy RNA- sekwencja promotorowa DNA] rozpadają się zwykle już przy 300-500 mM soli.

2a. W opisie metodyki izolacji białka SaoC z komórek *E. coli*, Doktorant stwierdza iż „Białko SaoC pozostaje we frakcji nierozpuszczalnej w postaci agregatów, w których zachowuje swoją natywną strukturę...” (str. 48). Na jakiej podstawie wysnuto wniosek o zachowaniu natywnej struktury przez zagregowane białka?

2b. Jeśli SaoC specyficznie i mocno wiąże się do sekwencji obecnych w DNA *E.coli*, powinien istnieć enterobakteryjny homolog tego białka. Nie znaleziono homologów *saoC* u *E.coli* na podstawie sekwencji nukleotydowej. Czy podobne poszukiwania Doktorant przeprowadził na poziomie białka, tzn. wykorzystując sekwencję aminokwasową w przeszukiwaniu białkowych baz danych? Czy sekwencja aminokwasowa SaoC wykazuje podobieństwo do domen występujących w czynnikach sigma? Czy istnieje podobieństwo do jakichś innych czynników wiążących DNA?

2c. DNazaI jest enzymem, który degraduje zarówno dsDNA jak i ssDNA. Czy wiadomo w jakiej formie występuje DNA związane w kompleksach z SaoC?

2d. Trudno jest dyskutować na temat miejsca wiązania ewentualnych czynników transkrypcyjnych przy braku zmapowania miejsca startu transkrypcji. Czy były podjęte próby określenia miejsca startu transkrypcji dla genu *saoC*?

2e. Doktorant argumentuje, że SaoC jako alternatywna sigma reguluje transkrypcję własnego genu ponieważ powyżej *saoC* znajduje się wysoce konserwowana sekwencja. Aby to udowodnić, należałoby przeprowadzić proste doświadczenie typu EMSA, tzn. zbadać wiązanie SaoC (w obecności i braku rdzenia polimerazy RNA) do wspomnianego fragmentu DNA *in vitro*. Czy takie próby zostały przeprowadzone?

2f. Czy zostały przeprowadzone przeszukiwania genomu *S. aureus* w celu odnalezienia sekwencji homologicznych do tej występującej powyżej genu *saoC*? W ten sposób można by zidentyfikować inne geny należące do hipotetycznego regulonu *saoC*, a następnie zbadać ich ekspresję w mutancie *knockout saoC* lub przy nadekspresji SaoC, np. poprzez RT-PCR.

3. Dane dotyczące lokalizacji SaoC w komórkach zostały przedstawione dosyć pobieżnie. Na podstawie załączonej ryciny (Rys. 15) dosyć trudno wnioskować o peryferyjnej lokalizacji tego białka bez przedstawienia obrazu bezsprzecznie pokazującego lokalizację DNA w badanych preparatach komórkowych (np. po wybarwieniu DAPI). Przydałaby się także kontrola w postaci wybarwienia ściany lub błony komórkowej (np. za pomocą Van-FL) lub zastosowania fuzji GFP z jakimś znanym białkiem oddziaływującym z błonami.

3a. Zabrakło również próby wyjaśnienia dlaczego fuzja *saoB-gfp* ulegała ekspresji tylko w nielicznych komórkach. Jaka jest opinia Doktoranta na ten temat?

4. Wyniki dotyczące występowania operonu *saoABC* w gatunkach z rodzaju *Staphylococcus* również zostały opisane bardzo pobieżnie. Doktorant wspomina jedynie o wykorzystaniu jakiegoś zoptymalizowanego zestawu starterów oraz mówi o potwierdzeniu występowania tego operonu w 29 z 36 gatunków *Staphylococcus*. Jakie są to gatunki? (W podpisie do Rys. 8 wymieniono ich tylko 25).

5. Pytanie rodzi też test badania wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* w modelu zarodka kurzego. W sekcji 6.8 (Metody) Doktorant podaje, że doświadczenia wykonano w 4 powtórzeniach po 40 jaj w każdym, a parę zdań dalej, iż istotność statystyczną badano tylko pomiędzy wartościami uśrednionymi z 2 eksperymentów. Skąd taka różnica?

Ogólnie, praca jest dosyć przejrzysta, napisana przystępnym językiem naukowym, w głównej mierze pozbawionym określeń żargonowych. Zachowana jest poprawna struktura przyjęta dla tego typu prac. Przedłożona rozprawa zawiera zarówno wykaz skrótów, jak i streszczenie w języku polskim i angielskim.

We wstępie, liczącym 18 stron, dokładnie opisano bakteryjne systemy regulacji transkrypcji genów, skupiając się głównie na systemach transdukcji sygnałów oraz na różnych podjednostkach sigma. Następnie na dwóch stronach zostały zgrabnie ujęte cele pracy, gdzie autor bardzo starannie starał się uzasadnić podjęcie przez niego tematyki badawczej opisanej w niniejszej pracy.

Metody, opisane na 19 stronach, w sposób zadowalający pozwalają na zrozumienie przeprowadzonych doświadczeń. Następny rozdział to Wyniki (16 stron), gdzie otrzymane dane zostały przedstawione i opisane dosyć pobieżnie. Być może zamiarem Doktoranta było zwięzłe przedstawienie tylko kluczowych wyników, niemniej jednak w zaprezentowanej formie powoduje to spory niedosyt i rodzi pytania dotyczące kluczowych, a nie opisanych i nie pokazanych, doświadczeń. Stąd też wynika spora liczba pytań przedstawiona na poprzednich stronach niniejszej recenzji. Niemniej wierzę, że Pan mgr Bukowski zna na nie odpowiedź i udzieli stosownych wyjaśnień podczas publicznej obrony.

W Dyskusji (9 stron) i Podsumowaniu (2 strony) Doktorant w dosyć dojrzały sposób omówił znaczenie uzyskanych przez siebie danych, odważnie przy tym przyznając, iż wyniki te ukazują jeszcze niepełny obraz regulacji i znaczenia operonu *saoABC*, niemniej jednak

otwierają pole do dalszych badań, które pozwolą na głębsze zrozumienie fizjologii i mechanizmów wirulencji *Staphylococcus aureus*.

Obszerny zakres cytowanej literatury (ok. 200 pozycji) pozwala na stwierdzenie, iż Doktorant świetnie orientuje się w szerokim zakresie prac z dziedziny mikrobiologii i biochemii. Podany jest również obszerny spis wykorzystanych zasobów internetowych i programów komputerowych.

Z obowiązku recenzenta muszę jednakże wspomnieć, iż Doktorant niestety nie ustrzegł się błędów edytorskich. Niekiedy pojawiają się błędy gramatyczne lub stylistyczne (np. „Testy różnic w antybiotykowrażliwości” zgrabniej byłoby określić poprostu jako „Testy na antybiotykowrażliwość”), czy drobne literówki (np. w podpisie do rys. 3, 4 i 5 – napisano „port” zamiast „prot”; opis primerów w Tabeli 1 – jest attbB zamiast attB). Poniżej przytaczam listę najważniejszych zastrzeżeń względem formy prezentacji pracy:

- Rys.1 wspomniany jest po raz pierwszy w tekście na stronie 14, natomiast jest przedstawiony dopiero na stronie 19,

- Rdzeń polimerazy RNA składa się z podjednostek α , β , β' i ω , a nie γ (str. 20),

- Nie wszystkie alternatywne podjednostki sigma są czynnikami ECF, np. u *E.coli* większość alternatywnych podjednostek sigma do nich nie należy (str. 20 „Główna podjednostka σ odpowiada za konstytutywną ekspresję genów, ale obok niej istnieją alternatywne formy tej podjednostki, których dostępność jest ściśle regulowana. Nazywane są one alternatywnymi podjednostkami ECF (podjednostki sigma funkcji pozacytoplazmatycznych, zewnątrzkomórkowych, ang. extracytoplasmic function sigma factors”)),

- Pewne zastrzeżenia budzi fakt przedstawienia na niektórych rycinach (Rys. 3, 4 i 5), wiązania podjednostek sigma do DNA bez obecności rdzenia polimerazy RNA. Być może Doktorant chciał w uproszczony sposób pokazać tylko schemat regulacji aktywności podjednostek sigma przez czynniki anty-sigma, jednakże nawet w towarzyszącym rycinom tekście nie znajduje się wzmianka o tym, że czynniki sigma w większości przypadków wiążą się do DNA tylko po utworzeniu holoenzymu z rdzeniem polimerazy (wyjątkiem jest sigma⁵⁴, która w pewnym stopniu może wiązać się do rejonu promotorowego bez rdzenia polimerazy),

- Rys.6B. W podpisie zaznaczono, iż każda druga ścieżka w parze to kontrola zanieczyszczenia wyjściowej próbki RNA przez DNA. Ponieważ specyficzne produkty pojawiają się właśnie w każdej drugiej ścieżce, a brak ich w pierwszych ścieżkach,

rozumiem, że doszło tu do błędu edytorskiego i właściwa interpretacja jest taka, że próbka kontrolna jest w każdej pierwszej ścieżce,

- Ponieważ doktorant wymienia oligonukleotydy wykorzystane w pracy, lista oligonukleotydów służąca do analizy występowania genu *saoC* wśród różnych gatunków gronkowca powinna być również podana,

- opis składu pożywek powinien zawierać końcowe stężenia danych związków, a nie dodane ilości (np. informacja, że do 20 ml pożywki M9 dodano 2 μ l 1M CaCl₂ jest nieco niezgrabna),

- w podrozdziale 6.1 nie podano sekwencji starterów M13-F i M-13R (odnośnik na str. 43)

- w podrozdziale 6.8 podano, iż do worka oączniowego wstrzykiwano 10⁻⁵ CFU bakterii; liczba ta wydaje się przesadnie mała, powinno chyba być 10⁵ CFU

Powyższe krytyczne uwagi dotyczące formy prezentacji nie wpływają jednak negatywnie na wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy doktorskiej. Należy także wspomnieć, iż przedłożona rozprawa jest częściowo owocem grantu Preludium, jaki Doktorant otrzymał w 2011r z NCN. Dodatkowo, część przedstawionych w pracy wyników została już opublikowana w liczących się czasopismach naukowych. Chodzi o wyniki, które posłużyły do rozwinięcia badań przedstawionych w podrozdziale 7.2 (powiązanie operonu *saoABC* z systemem toksyna-antytoksyna pemIK_{Sa}), a zostały ujęte w pracy Bukowski i wsp. (2013) *Nature Communications* i właściwie stały się punktem wyjścia dla przedstawionej rozprawy, oraz o podrozdział 7.1.3 (występowanie operonu *saoABC* u różnych gatunków *Staphylococcus*), który został ujęty w pracy Bukowski i wsp. (2015) *FEMS Microbiology Letters*.

Podsumowując, stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pana magistra Michała Bukowskiego spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim. Przedstawione wyniki mają spore znaczenie poznawcze i w znaczący sposób mogą przyczynić się do rozwoju wiedzy na temat fizjologii i wirulencji *Staphylococcus aureus*. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgr Michała Bukowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.