



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Genetyki i Biotechnologii  
prof. dr hab. Paweł Golik



Warszawa, 23.02.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Katarzyny Szustakowskiej pt. „Rola struktury drugorzędowej RNA w regulacji translacji w odpowiedzi na stres antybiotykowy u bakterii anytbiotykoopornych na przykładzie metycylinoopornego szczepu *Staphylococcus aureus*”

*Staphylococcus aureus* jest jednym z najistotniejszych klinicznie patogenów człowieka, a szczególnie dotkliwym w przypadku tych bakterii problemem jest oporność na wiele antybiotyków. Do najważniejszych antybiotyków stosowanych w zakażeniach metycylinoopornym szczepem *S. aureus* (MRSA) należy wankomycyna, coraz częściej dochodzi jednak do pojawiania się szczepów na nią opornych. Znaczenie kliniczne infekcji MRSA powoduje, że zrozumieniu mechanizmów nabywania oporności na antybiotyki przez te bakterie poświęcono bardzo liczne badania. Mimo to, wiele z tych mechanizmów wciąż nie zostało opisanych i zjawisko to jest dalekie od pełnego wyjaśnienia. Doktorantka podjęła się zbadania mechanizmów, za pomocą których bakterie MRSA modulują ekspresję genomu po pojawieniu się w środowisku antybiotyku. Skupiła się tu na bardzo ciekawych i wciąż słabo poznanych prokariotycznych mechanizmach regulacji translacji poprzez zmiany w strukturze przestrzennej cząsteczek mRNA. Wiadomo, że takie mechanizmy jak ryboprzełączniki odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów bakteryjnych, nie znalazłem jednak w literaturze całościowych badań nad ich rolą w odpowiedzi na działanie antybiotyków u *S. aureus*. Zadania, których rozwiązania podjęła się Doktorantka spełniają zatem najważniejsze moim zdaniem kryterium – podejmują się rozwiązania naprawdę istotnego poznawczo i oryginalnego problemu naukowego w dyscyplinie nauki biologiczne.

Praca ma formę tradycyjnej rozprawy i opisuje wyniki, które nie zostały dotychczas opublikowane. Praca prawidłowo cytuje właściwą literaturę i od strony formalnej spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu tekstom naukowym. Autorka stosuje prawidłową terminologię naukową, a rozprawa została starannie przygotowana i zredagowana. Oczywiście, jak zawsze w tego typu tekstach, miejscami trafiają się pojedyncze drobne błędy lub niefortunne sformułowania, jest ich jednak niewiele i nie wpływają na odbiór tekstu. Nawyki wieloletniego dydaktyka genetyki każą mi jedynie zwrócić uwagę na błędny skrót myślowy w podsumowaniu na s. 124 „[...] geny aktywowane translacyjnie w warunkach traktowanych oraz nietraktowanych lokalizują się głównie w obrębie błon

komórkowych i cytoplazmy [...]”, gdzie lokalizują się oczywiście nie geny, lecz kodowane przez nie białka.

Rozpoczynający pracę wstęp zawiera zwięzły opis różnorodnych bakterii chorobotwórczych i stosowanych w walce z nimi antybiotyków i mechanizmów nabywania oporności, ze szczególnym uwzględnieniem będącego przedmiotem opisanych w dalszej części pracy MRSA. Jest to oczywiście niesłychanie rozległa tematyka, Doktorantce udało się jednak znaleźć właściwy kompromis między zwięzłością a przekazaniem niezbędnych do zrozumienia opisywanych badań informacji. Zabrakło mi tu jedynie wzmianki o potencjalnie istotnym dla projektu zjawisku polegającym na tym, że nawet zasadniczo wrażliwe na wankomycynę szczepy *Staphylococcus* mogą znacząco różnić się podatnością na antybiotyk. Tu ważne jest rozróżnienie między minimalną dawką bakteriobójczą (MBC: minimal bactericidal concentration) i minimalną dawką hamującą (MIC: minimal inhibitory concentration). Istnieją szczepy wrażliwe na hamujący wzrost efekt wankomycyny, ale wymagające o wiele większych stężeń do osiągnięcia efektu bakteriobójczego. Takie szczepy o stosunku  $MBC/MIC > 32$  nazywa się szczepami tolerującymi wankomycynę (VT-MRSA). Jestem ciekaw, jak pod tym względem wyglądał użyty w projekcie szczep i jak miało się użyte stężenie antybiotyku (opisane jako subletalne) do wartości MIC i MBC?

W dalszej części wstępu znalazło się zwięzłe wprowadzenie do problematyki translacji u bakterii i wyczerpujące omówienie mechanizmów regulacji translacji przez zmiany struktury drugorzędowej mRNA, na badaniu których zasadzał się projekt badawczy.

Po lekturze wstępu nie mam żadnych wątpliwości, że Doktorantka wykazuje się rozległą ogólną wiedzą teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne, obejmującą zagadnienia mikrobiologii, biologii molekularnej i bioinformatyki, i przez to spełnia ustawowe wymagania stawiane przed kandydatami do uzyskania stopnia doktora.

Część opisująca materiały i metody została przygotowana starannie i wyczerpująco i zawiera wszystkie informacje niezbędne do pozytywnej oceny zastosowanych metod badawczych. Jedynie, biorąc pod uwagę to, że istotnym wkładem Doktorantki było przygotowanie programów i potoków obliczeniowych, uważam, iż cennym uzupełnieniem tej części pracy byłby adres repozytorium z kodem źródłowym.

W sekcji 3.10.2 Autorka opisuje stworzone na potrzeby projektu narzędzie bioinformatyczne – potok obliczeniowy do mapowania odczytów do genomu referencyjnego i filtrowania zmapowanych odczytów na podstawie pokrycia z określonymi regionami adnotacji. Na s. 63, Doktorantka pisze, że narzędzie umożliwia analizę w trybie genomycznym lub transkryptomycznym, a następnie stwierdza, że w przeprowadzonej analizie do usunięcia odczytów rRNA i tRNA wykorzystano tryb genomyczny. Jestem ciekaw, dlaczego wybrała ten tryb, skoro analizowane odczyty pochodziły z

eksperymentów transkryptomocnych (RNA-seq, Ribo-seq i SHAPE-MaP to techniki transkryptomocne)?

Czysto edytorską uwagą jest natomiast to, że sekcje 3.3.1 i 3.3.2 zawierające ogólny opis użytych w eksperymencie antybiotyków pasują bardziej do wstępu, niż do części przeznaczonej zasadniczo na protokoły eksperymentalne. Podobnie techniczną uwagą jest to, że w podpisie do Ryc. 6 podano, że rejon wiążący rybosom ma długość 5 nt, podczas gdy na samej rycinie przedstawiona jest sekwencja konsensusowa o długości 6 nt. Na podstawie lektury tej części pracy nie mam jednak wątpliwości co do tego, że Doktorantka opanowała warsztat metodologiczny i wykazała się umiejętnością prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.

Punktem wyjścia dla opisanych w rozprawie badań jest hipoteza, że w odpowiedzi na stres antybiotykowy bakterie regulują ekspresję genów za pomocą modulacji wydajności translacji zależnej od struktur przestrzennych mRNA. Jak wykazała to Autorka we wstępie, takie mechanizmy są u prokariotów powszechne, idea zbadania ich roli w odpowiedzi MRSA na antybiotyki jest zatem ze wszech miar uzasadniona. Pomysł przeprowadzonych badań należy zatem ocenić wysoko. Podobnie, na bardzo wysoką ocenę zasługuje wybór technik, którymi Doktorantka posłużyła się w realizacji projektu. Jednoczesne zastosowanie protokołu Ribo-seq i SHAPE-MaP pozwala na powiązanie zmian w aktywności translacyjnej ze zmianami w strukturze mRNA i stanowi bardzo wartościowy i nowatorski aspekt pracy.

Rezultaty projektu zebrane zostały w sekcji łączącej wyniki z dyskusją, co jest przyjętym sposobem opisywania projektów polegających na analizie danych szeroko pojmowanej genomiki. W pierwszym etapie Doktorantka przeprowadziła wstępną, choć niezwykle istotną obróbkę uzyskanych danych sekwencyjnych, która pozwoliła na konkluzję, że są one dobrej jakości i mogą stanowić podstawę wiarygodnych analiz różnicowych. Następnie przeprowadzone zostały analizy porównawcze dla wykazania różnic w poziomie transkryptów, aktywności translacyjnej i reaktywności strukturalnej mRNA pomiędzy kontrolą a bakteriami poddanymi działaniu antybiotyku. W porównaniach poziomu mRNA i aktywności translacyjnej uderzające jest to, że raczej wbrew oczekiwaniom, istotne statystycznie różnice zaobserwowano tylko dla pojedynczych genów. Do tego, wbrew temu, co Doktorantka stwierdza na s. 86-87 („[...] różnice w zmianie poziomów translacji (Ryc.11) są powiązane z różnicami w zmianach poziomu mRNA (Ryc. 9).”), jedyny gen wykazujący istotną różnicę w poziomie mRNA (SAV\_RS13050) nie dał istotnych statystycznie różnic w aktywności translacji.

W tym miejscu pojawić się może pytanie o przyczyny tak niewielkiej liczby istotnych statystycznie różnic, mimo tego, że w literaturze znaleźć można wiele przykładów genów *Staphylococcus*, których ekspresja zmienia się pod wpływem działania antybiotyku. Nie będąc

specjalistą w tej konkretnie tematyce, zastanawiam się, czy nie jest to związane z bardzo krótkim czasem ekspozycji na antybiotyki w eksperymencie. Opis w sekcji 3.4 sugeruje, że po dodaniu antybiotyku inkubację prowadzono przez 30 minut. Tymczasem w przykładowych publikacjach (np. Rose i wsp. 2012 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:4422-27) zmiany ekspresji genów pod wpływem wankomycyny pojawiały się po czasie wielu godzin. W pracy Abdelhady i wsp. 2015 (*J Antimicrob Chemother.* 70(5):1443-52) po 2h ekspozycji na antybiotyk nie widać zmian ekspresji badanych genów, zaczynają się one manifestować dopiero po 4h. Podobnie w badającej zmiany ekspresji krótkich RNA pracy Howden i wsp. 2013 (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:3864-74) większość różnic pojawia się po 6h inkubacji z wankomycyną (a tylko część po 2h). Oczywiście regulacja translacji przez zmiany struktury RNA powinna być mechanizmem szybkim, ale czy ograniczeniem nie jest też czas penetracji antybiotyku do komórek? Czy zastosowanie dłuższej inkubacji z antybiotykiem nie pozwoliłoby na uzyskanie bardziej znaczących wyników?

Najwięcej istotnych różnic dostarczyła analiza reaktywności (struktury) RNA w eksperymencie SHAPE-MaP. Tu jednak znowu zwraca uwagę to, że spośród zidentyfikowanych różnic, żadna nie pokrywa się z istotnymi różnicami w aktywności translacyjnej, nie udało się zatem przekonująco wykazać, że w odpowiedzi na antybiotyk uruchamiane są mechanizmy kontrolujące translację poprzez zmiany struktury RNA. Nie jest to w mojej opinii zarzut wobec pracy – wyniki negatywne są nieodłączną częścią pracy badawczej i też niosą istotną wartość poznawczą, zwłaszcza w przekrojowych analizach genomicznych. Wciąż jednak zastanawiam się, czy wydłużenie czasu ekspozycji na antybiotyk nie pozwoliłoby na zaobserwowanie bardziej wyraźnych i łatwiejszych w interpretacji trendów.

Mimo braku wyraźnego sygnału w najprostszych analizach różnicowych, Doktorantka kontynuowała eksplorację uzyskanych danych za pomocą bardziej zaawansowanych technik statystycznych i obliczeniowych, w tym z wykorzystaniem opracowanego samodzielnie programu pomagającego powiązać zmiany struktury mRNA ze zmianami aktywności translacyjnej. Niezależnie od tego, co udało się (lub nie) uzyskać z analizowanych w projekcie danych, opracowanie tego narzędzia (opisanego w sekcji 4.1.6) i całego zestawu analiz statystycznych uważam za duże osiągnięcie naukowe i istotny wkład Doktorantki w rozwój nauki. Po raz kolejny Doktorantka wykazała się dużą wiedzą i umiejętnością rozwiązywania problemów naukowych, a także godną podziwu wytrwałością.

Zachęcona obiecującymi wynikami wstępnej analizy MDS danych aktywności translacyjnej, Doktorantka przeprowadziła staranną i dogłębną analizę klastrowania uzyskanych za pomocą swojego narzędzia danych zbierających różne typy rezultatów. Okazało się jednak, że optymalne klastrowanie uzyskuje się dla cech pochodzących wyłącznie z analizy struktury RNA (SHAPE-MaP),

bez uwzględniania różnic w aktywności translacji. Można było się tego spodziewać, biorąc pod uwagę to, że właściwie tylko eksperyment SHAPE-Map wykazał istotne różnice między warunkami hodowli w większej liczbie genów. Ważnym i ciekawym wynikiem jest natomiast to, że największą wartość mają dane uwzględniające sekwencję RBS i kodon start, w porównaniu z danymi zbiorczymi dla dłuższego odcinka mRNA, czy krótszymi motywami pojedynczo.


W dalszym ciągu pracy Doktorantka poszukiwała korelacji pomiędzy zmianami w strukturze mRNA a zmianami w aktywności translacyjnej. Ponieważ wcześniejsze analizy wykazały, że większość różnic w aktywności translacyjnej była nieistotna, uzyskanie stosunkowo słabych współczynników korelacji nie jest zaskakujące. Jedynie dane strukturalne dały się optymalnie wykorzystać w klastrowaniu, trudno więc oczekiwać istotnych korelacji między zmianami struktury a zmianami aktywności translacyjnej. Ponownie jednak, za sukces naukowy można uznać samo opracowanie ścieżki takich analiz, niezależnie od uzyskanych wyników. Ta część analizy nasuwa też pytanie – jak opisywane od s. 113 i na Ryc. 30 „ćwiartki” wykresów mają się do zidentyfikowanych wcześniej klastrów? Zbędne jest też w wykresach takich, jak na Ryc. 30 pokazywanie całych macierzy 3x3 – korelacja jest relacją symetryczną, więc macierz też jest symetryczna, a na jej diagonalnej zawsze będą wartości 1 (korelacja zbioru samego z sobą), wystarczą więc 3 pola z 9. Z kolei, potencjalnie interesującą jest obserwacja (na s. 114), że wartości współczynnika korelacji są wyższe, gdy w porównaniach jest hodowla traktowana wankomycyną. Czy na tej (i reszty wyników) podstawie można stwierdzić, że wankomycyna silniej wpływa na strukturę mRNA i translację od cefotaksymu?

W opisywanych od s. 115 analizach Doktorantka podejmuje się „wyodrębnienia modułów regulacyjnych” związanych z reakcją na antybiotyk. Trudno tu oczekiwać istotnych rezultatów, skoro wcześniejsze analizy nie wykazały istotnych różnic w aktywności translacyjnej i ekspresji mRNA (z wyjątkiem pojedynczych genów), modułów takich nie udało się też klarownie wyodrębnić w klastrowaniu. Nie oznacza to jednak, że ta część analizy była zbędna – jak i poprzednio, tak i tu cennym osiągnięciem jest opracowanie metody, która pozwoli na uzyskanie wartościowych informacji na podstawie bogatszych w sygnał zbiorów danych. Dotyczy to też analizy kategorii GO identyfikowanych genów (Ryc. 32-35), z tym, że tu należałoby wyniki odnieść do udziału odpowiednich kategorii w adnotacji całego genomu (analiza wzbogacenia).

Zgodnie z regułami pisania tekstów naukowych, w których wyniki i dyskusję połączono w jedną całość, Doktorantka umieściła na końcu zwięzłe podsumowanie najważniejszych rezultatów. W odniesieniu do tej części mam jedną uwagę – na s. 126 Autorka sugeruje, że „[...] mechanizmy regulacyjne w odpowiedzi na stres antybiotykowy, w tym przypadku zachodzą głównie na poziomie struktury RNA lub transkrypcji, a nie translacji.” Czy wyniki analizy RNA-seq, wykazujące istotną

statystycznie różnicę poziomu tylko dla jednego transkryptu nie wykluczają w tym przypadku regulacji na poziomie transkrypcji?

Podsumowując – Doktorantka w trakcie pracy rozwiązała istotny poznawczo i praktycznie problem i wykazała się umiejętnością prowadzenia samodzielnej pracy naukowej, spełniając tym samym ustawowe wymagania stawiane przed kandydatami do stopnia naukowego doktora. Zarówno sformułowane pytania naukowe, jak i zaproponowane przez Doktorantkę rozwiązania są całkowicie oryginalne i przyczyniają się do postępu wiedzy. W podsumowaniu stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr. Marty Katarzyny Szustakowskiej pt. „Rola struktury drugorzędowej RNA w regulacji translacji w odpowiedzi na stres antybiotykowy u bakterii antybiotykkoopornych na przykładzie metycylinoopornego szczepu *Staphylococcus aureus*” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na tej podstawie stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Marty Katarzyny Szustakowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Paweł Golik