



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Zakład Biochemii Analitycznej
Dr hab. Benedykt Władyka

**Ocena
osiągnięcia naukowego oraz dorobku naukowo-dydaktycznego w
postępowaniu habilitacyjnym dr Barbary Kędzierskiej**

Wieloletnia kariera naukowa Pani Barbary Kędzierskiej datuje się od roku 1998, kiedy to po uzyskaniu tytułu magistra biologii rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Gdańskiego. W latach 2002-2006 Pani B. Kędzierska pracowała jako asystent, w międzyczasie uzyskała stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Mechanizm aktywacji transkrypcji przez białko CII bakteriofaga λ ”, której promotorem był prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn. Następnie odbyła ponad dwuletni staż podoktorski w Manchester Interdisciplinary Biocentre, University of Manchester w Wielkiej Brytanii. Po powrocie ze stażu dr B. Kędzierska zatrudniona była na stanowisku adiunkta w Katedrze Biologii Molekularnej (do 2016 r.). Od 2017 r. do chwili obecnej pracuje w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. W przedstawionym powyżej okresie (25 lat) dr B. Kędzierska opublikowała 15 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej, w tym 4 przed uzyskaniem stopnia doktora. Z tego zbioru Habilitantka wyodrębniła 7 prac (5 oryginalnych i 2 przeglądowe), które stanowią przedmiot osiągnięcia naukowego będącego głównym składnikiem ocenianego dorobku w toku postępowania habilitacyjnego.

Ocena osiągnięcia naukowego

W skład przedstawionego do oceny osiągnięcia zatytułowanego „**Molekularne podstawy regulacji ekspresji genów i mechanizmu specyficzności pomiędzy homologicznymi systemami toksyna-antytoksyna z bakterii *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium***” wchodzi 7 prac opublikowanych okresie od 2007 do 2021 roku.

	Praca	IF	Liczba cytowań [#]
1	Kędzierska B , Lian LY, Hayes F*. (2007). Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. <i>Nucleic Acids Res.</i> 35: 325-39.	6,954	62
2	Boss L, Labudda L, Węgrzyn G, Hayes F, Kędzierska B* . (2013). The Axe-Txe complex of <i>Enterococcus faecium</i> presents a multilayered mode of toxin-antitoxin gene expression regulation. <i>PLoS One.</i> 8: e73569	3,534	14
3	Połom D, Boss L, Węgrzyn G, Hayes F, Kędzierska B* . (2013). Amino acid residues crucial for specificity of toxin-antitoxin interactions in the homologous Axe-Txe and YefM-YoeB complexes. <i>FEBS J.</i> 280: 5906-18.	3,986	12
4	Hayes F*, Kędzierska B* . (2014). Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. <i>Toxins (Basel)</i> 6: 337-58.	3,229	60
5	Kędzierska B* , Hayes F*. (2016). Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. <i>Molecules.</i> 2: pii: E790.	2,861	80
6	Kędzierska B* , Potrykus K, Szalewska-Pałasz A, Wodzikowska B. (2020). Insights into Transcriptional Repression of the Homologous Toxin-Antitoxin Cassettes yefM-yoeB and axe-txe. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 21, 9062.	4,556	2
7	Kędzierska B* , Potrykus K. (2021). Minigene as a Novel Regulatory Element in Toxin-Antitoxin Systems. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 22, 13389.	6,208	1

[#] według bazy Web of Science na dzień przygotowania oceny, *autor korespondujący

W powyższych pracach dr B. Kędzierska jest autorem korespondującym w sześciu z nich a w jednej pozostałej jest pierwszym autorem. Oświadczenia Habilitantki jak również pozostałych współautorów prac jednoznacznie wskazują na wiodący udział dr. B. Kędzierskiej w badaniach, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu ww. publikacji.

Przedstawione osiągnięcie dotyczy badań nad dwoma systemami toksyna-antytoksyna (TA) ze szczególnym uwzględnieniem molekularnych mechanizmów regulujących ich ekspresję. Systemy TA występują powszechnie u bakterii a ich rola, pomimo wieloletnich badań, nadal jest przedmiotem dyskusji naukowych. O ile ogólnie akceptowany jest fakt, że plazmidowo kodowane systemy TA biorą udział w stabilizacji i prawidłowym dziedziczeniu tych ruchomych elementów genetycznych, to w przypadku systemów TA kodowanych w chromosomie bakteryjnym proponowanych jest co najmniej kilka funkcji zarówno w

kontekście pojedynczej komórki, populacji bakterii jak i ewolucji tych mikroorganizmów. Szczególnie interesujące wydaje się być powiązanie systemów TA z wirulencją bakterii, a co za tym idzie możliwością wykorzystania tych systemów do walki z patogenami. Ten potencjalny aplikacyjny aspekt nie byłby jednak możliwy bez dogłębnego poznania i zrozumienia molekularnych mechanizmów oddziaływania komponentów systemów TA ze sobą jak również regulacji ich produkcji. Badania dr B. Kędzierskiej niewątpliwie przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat regulacji ekspresji genów systemów TA.

W pracy opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research* (pozycja 1 w tabeli) opisano mechanizm kontroli ekspresji systemu *yefM-yoeB* kodowanego w chromosomie bakterii *Escherichia coli*. Kluczowym dla całego badania było wykazanie, że wbrew wcześniejszym doniesieniom literaturowym antytoksyna YefM jest białkiem o 10 aminokwasów krótszym od N-końca, co przekłada się na jego uorganizowaną strukturę przestrzenną, w szczególności w rejonie oddziałującym z DNA. Po zidentyfikowaniu promotora operonu *yefM-yoeB* wyznaczono miejsca wiązania antytoksyny w obrębie promotora oraz wykazano, że wiązanie takie powoduje zahamowanie ekspresji genu reporterowego pod kontrolą tego promotora. Ponadto, udowodniono, że kompleks YefM-YoeB z większym powinowactwem oddziałuje z promotorem i silniej niż sama antytoksyna hamuje ekspresję genów. Zatem kontrola ekspresji systemu TA YefM-YoeB polega na negatywnej autoregulacji na poziomie inicjacji transkrypcji, a palindromowe motywy rozpoznawane przez antytoksynę są rozpowszechnione w obrębie promotorów homologicznych systemów TA u innych bakterii, co może wskazywać nie tylko na uniwersalność mechanizmu kontroli ich ekspresji ale również na możliwość wzajemnych interakcji pomiędzy systemami TA w pojedynczej komórce bakteryjnej. Ta ostatnia hipoteza jest zarówno bezpośrednio jak i pośrednio weryfikowana w dalszych badaniach Habilitantki.

Drugim systemem TA będącym przedmiotem zainteresowań badawczych dr B. Kędzierskiej jest Axe-Txe, kodowany na plazmidzie pRUM *Enterococcus faecium*. W oparciu o wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazujące, że system ten efektywnie działa nie tylko u enterokoków, ale również w filogenetycznie odległych gatunkach bakterii, Habilitantka podjęła się szczegółowych badań nad regulacją genów tego systemu (pozycja 2 w tabeli). W odróżnieniu do systemu *yefM-yoeB*, system *axe-txe* wykazuje znacznie bardziej skomplikowany i wielopoziomowy mechanizm regulacji. Ekspresja operonu skutkuje aż

trzema różnymi transkryptami powstającymi w wyniku aktywności trzech niezależnych promotorów. Ponadto zidentyfikowano motyw strukturalny spinki do włosów zlokalizowany tuż za genem toksyny regulujący najprawdopodobniej stabilność transkryptu a w konsekwencji poziom toksyny Txe w komórce wpływający na kinetykę wzrostu bakterii. Warto podkreślić, że badania te były prowadzone w ramach projektu badawczego kierowanego przez Habilitantkę.

W kolejnej pracy eksperymentalnej (pozycja 3 w tabeli) dr B. Kędzierska z sukcesem odpowiada na pytanie naukowe dotyczące mechanizmów warunkujących specyficzność oddziaływania komponentów systemów TA w obrębie systemu jak i możliwych krzyżowych interakcji pomiędzy innymi, acz homologicznymi lub podobnymi, systemami TA. W szeregu eksperymentów z wykorzystaniem bakteryjnego systemu dwuhybrydowego oraz analiz znoszenia toksyczności toksyny przez antytoksynę wykazano specyficzność oddziaływania komponentów systemów w obrębie par toksyna-antytoksyna. Ponadto, w oparciu o dostępne dane strukturalne dla kompleksu YefM-YoeB i posiłkując się modelem kompleksu Axe-Txe stworzonym w ramach nawiązanej współpracy naukowej udało się wytypować reszty aminokwasowe potencjalnie determinujące różnice w domenach wiążących białka toksyny i antytoksyny. W toku dalszych badań potwierdzono determinanty specyficzności tego oddziaływania polegające na odpowiednim ułożeniu pierścieni aromatycznych tyrozyny w pozycji 53 i 82, odpowiednio w YefM i YoeB. Natomiast w przypadku homologicznego systemu Axe-Txe, specyficzna interakcja warunkowana jest oddziaływaniami jonowymi pomiędzy, odpowiednio arginina 54 i kwasem asparaginowym 83.

W pracy opublikowanej w *Int. J. Mol. Sci.* w 2020 r. (pozycja 6 w tabeli) Habilitantka podchodzi do tematu specyficzności działania i regulacji systemów TA od strony ekspresji ich genów. Dr B. Kędzierska zaobserwowała, że pomimo podobnej budowy rejonów promotorowych oraz sekwencji operatorowych, aktywność transkrypcyjna promotorów p_{yy} i p_{at} oraz poziom ich represji są różne. Promotor p_{yy} (systemu YefM-YoeB) jest słabszy i ulega całkowitej inhibicji przez kompleks TA, z kolei promotor p_{at} jest niezwykle silny i jest tylko częściowo hamowany przez białka systemu Axe-Txe. W toku badań wykazano, że różnice sekwencji w rejonie -35 promotorów tych systemów są odpowiedzialne za poziom aktywności transkrypcyjnej. Natomiast różnice w położeniu sekwencji palindromowych w rejonie operatorowym w stosunku do głównych elementów promotora wpływają na

regulacje poprzez białka badanych systemów TA. I choć kompleksy TA mogą oddziaływać zarówno z operatorem własnego systemu jak również krzyżowo, to możliwość wiązania polimerazy RNA w zależności od położenia sekwencji operatora i wiązania represora (kompleksu TA) ogrywa kluczową rolę w aktywacji lub represji transkrypcji.

W najnowszej pracy (Kędzierska i Potrykus 2021, pozycja 7 w tabeli) wchodzącej w skład ocenianego osiągnięcia dr B. Kędzierska wraca do badania regulacji ekspresji systemu *axe-txe* identyfikując „minigen” zlokalizowany w obrębie genu antytoksyny, kodujący dipeptyd, którego działanie *in cis* stabilizuje ekspresję genu toksyny Txe. W toku eksperymentów wykazano, że kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji *txe* ma odległość minigenu od miejsca startu translacji (kodon start ATG), natomiast sekwencja i długość minigenu nie jest krytyczna dla jego funkcjonowania jako regulatora translacji genu toksyny. Należy zwrócić uwagę, że choć badania dotyczyły konkretnego systemu TA to zastosowany układ eksperymentalny pozwolił na uzyskanie bardziej uniwersalnych wyników, które wskazują na możliwość kontroli ekspresji genów przez minigeny, co uważam za bardzo wartościowe odkrycie naukowe. Pośrednim potwierdzeniem uniwersalności takiego mechanizmu regulacyjnego jest bioinformatyczna identyfikacja minigenów w systemach TA należących do rodzin *relBE* i *mazEF*. Ponadto, w dyskusji przedstawiono ciekawe hipotezy kontroli translacji poprzez minigeny postulujące wpływ minigenów na wiązanie rybosomów do mRNA i inicjację biosyntezy białka w zależności od odległości położenia minigenu od miejsca wiązania rybosomu i startu translacji właściwego genu podlegającego regulacji. Daje to przyczynek do dalszych ciekawych badań nie tylko nad regulacją ekspresji genów systemów TA ale również innych genów u bakterii.

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi również dwie prace przeglądowe. W pierwszej z nich (pozycja 4 w tabeli) przedstawiono mechanizmy regulacji ekspresji systemów TA typu II. Praca ta również pozwoliła na zaprezentowanie wyników własnych Habilitantki w kontekście znanych już sposobów kontroli systemów TA. Należy zaznaczyć, że badania nad systemami TA prowadzone były i są na wielu płaszczyznach, zatem zbieranie i systematyzowanie tej wiedzy w pracach przeglądowych jest pożądane i, co pokazuje liczba cytowań, doceniane przez środowisko naukowe. Poznanie mechanizmów regulacji ekspresji systemów TA i molekularnych podstaw ich działania, w tym efektu toksyczności, otwiera drogę do aplikacyjnego zastosowania tego potencjału systemów TA, np. jako alternatywy dla

antybiotyków. Zostało to celnie zasygnalizowane przez Habilitantkę w omawianej pracy przeglądowej. W drugiej pracy (pozycja 5 w tabeli) dr B. Kędzierska i dr F. Hayes dokonują przeglądu literatury pod kątem zaangażowania systemów TA w formowanie przez bakterie fenotypu „persister” oraz tworzenie biofilmu. W drugiej części pracy opisują systemy TA u bakterii patogennych w kontekście ich roli w wirulencji i wrażliwości na działanie antybiotyków. Co istotne i z czasem jeszcze bardziej aktualne, zwrócono uwagę na mnogość systemów TA u poszczególnych bakterii, ich wzajemne interakcje oraz, co najważniejsze, rolę bakteryjnych proteaz jako swego rodzaju wyzwalaczy toksyczności systemów TA. Szczególnie wartościowe są schematy lokujące proteazę Lon jako „hub” regulujący poziom antytoksyn a tym samym wpływającą na zdolność komórki do podziałów i aktywnego prowadzenia metabolizmu.

Podsumowując ocenę osiągnięcia naukowego stwierdzam, że przedstawione wyniki są wartościowe i wpisują się w trendy badawcze współczesnej bakteriologii. Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat technik biologii molekularnej stosowany w badaniach, w szczególności wykorzystanie transkrypcji *in vitro*, genów reporterowych oraz odpowiednio dobranych szczepów bakteryjnych. Należy zaznaczyć również, że prowadzone badania w dużej części były finansowane z projektu, którego dr B. Kędzierska była kierownikiem. Ponadto Habilitantka współpracowała, często inicjując taką współpracę, z badaczami w kraju i zagranicą.

Ocena dorobku naukowo-dydaktycznego

Jak wspomniano we wstępie, całkowity dorobek naukowy dr B. Kędzierskiej stanowi 15 prac z opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Z wyłączeniem prac stanowiących osiągnięcie naukowe, Habilitantka jest pierwszym autorem jeszcze w 4 pracach co świadczy o dużym zaangażowaniu w badania naukowe. Co istotne dr B. Kędzierska wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni. W szczególności owocne okazały się zagraniczne staże naukowe (w University of Sheffield Medical School, University of Birmingham i University of Manchester) gdzie Habilitantka zdobyła nie tylko doświadczenie w różnorodnych technikach umożliwiających badanie procesu transkrypcji metodami *in vitro* i oczyszczania białek rekombinowanych ale również nawiązała długotrwałą współpracę naukową owocującą wspólnymi publikacjami w tak prestiżowych czasopiśmie

jak NAR czy PNAS. Dr B. Kędzierska współpracuje również z badaczami w kraju, m.in. z prof. dr hab. Katarzyną Potrykus z Wydziału Biologii UG czego dowodem są wspólne publikacje i istotny udział w realizacji wspólnych projektów badawczych. Należy podkreślić bardzo duże doświadczenie Habilitantki w posługiwaniu się szerokim wachlarzem technik biologii molekularnej. Co istotne dr B. Kędzierska była też kierownikiem grantu MNiSW, co świadczy o umiejętności do samodzielnego uzyskiwania finansowania prowadzonych badań naukowych. Dr B. Kędzierska może wykazać się też innymi osiągnięciami ważnymi przy aplikacji o stopień naukowy doktora habilitowanego, w tym wygłoszeniem wykładów na zaproszenie, udziałem w konferencjach naukowych, recenzjami manuskryptów dla czasopism naukowych i współpracą naukową z ośrodkami krajowymi.

Dr B. Kędzierska wykazuje się też pokaźnym dorobkiem dydaktycznym. Była promotorem pomocniczym w zakończonym przewodzie doktorskim oraz opiekunem naukowym szeregu prac magisterskich i licencjackich. Habilitantka prowadzi(ła) też wykłady, ćwiczenia i seminaria z mikrobiologii, genetyki bakterii i biologii molekularnej. Prowadzi też działalność popularyzującą naukę (wielokrotny udział w Bałtyckim Festiwalu Nauki) oraz organizacyjną m.in. jako członek Rad i Komisji na Uniwersytecie Gdańskim.

Wnioski końcowe

W trakcie wieloletniej kariery naukowej dr Barbara Kędzierska zebrała wartościowy całościowy dorobek naukowy, który został doceniony przez środowisko naukowe o czym świadczy wysoka liczba cytowań. Przedstawione wyodrębnione osiągnięcie naukowe jest znaczące, tematycznie spójne a stosowne oświadczenia rzetelnie dokumentują wiodącą rolę Habilitantki. Działalność dydaktyczna jest obszerna a aktywność organizacyjna popularyzująca naukę również została wykazana. Zatem przedstawiony do oceny całokształt osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych i popularyzatorskich upoważnia mnie do stwierdzenia, że **dr B. Kędzierska w pełni spełnia wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego** określone w art. 219 ust. 1 pkt 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wniosuję zatem o nadanie dr Barbarze Kędzierskiej stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Dr hab. Benedykt Władyka