



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2021-11-09

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Zakład Terapii Fagowej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirsztfelda
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirsztfeld.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Roszniowskiego

pt. „Charakterystyka genetyczna fagów łagodnych i litycznych, specyficznych dla *Burkholderia cenocepacia* i *Klebsiella pneumoniae*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Bartosza Roszniowskiego została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor Zuzanny Drulis-Kawy, w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca dotyczy bakteriofagów związanych z istotnymi z punktu widzenia problemów medycznych patogenami bakteryjnymi: *Burkholderia cenocepacia* i *Klebsiella pneumoniae*.

Praca ma charakter tradycyjnej monografii, obejmującej takie typowe rozdziały jak *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Bibliografia*. Nietypowe jest umieszczenie dwóch podrozdziałów o charakterze dyskusji wewnątrz rozdziału *Wyniki*. Ponadto uwzględniono elementy pomocnicze jak *Spis treści*, *Streszczenie*, angielskojęzyczny *Abstract*, a także bardzo obszerne *Materiały uzupełniające*, zawierające kilkadziesiąt tabel i rysunków prezentujących dane uzyskane w toku realizacji projektu doktorskiego. Struktura pracy jest więc w większości typowa i poprawna, ewentualnie mogłaby zostać poszerzona o brakujący spis skrótów oraz wyodrębnione wnioski.



Przystępując do analizy treści przedstawionej do oceny pracy, chciałabym zacząć od przejrzystego i dobrze napisanego wstępu. Znajdujemy w nim aktualne informacje na temat klasyfikacji taksonomicznej bakteriofagów, dość szczegółową prezentację tzw. cykli życiowych bakteriofagów, opis mechanizmów oporności bakterii na bakteriofagi, opis roli bakteriofagów w horyzontalnym transferze genów i dywersyfikacji *Prokaryota*, a także charakterystykę gatunków bakterii, których fagi były przedmiotem badań. Wstęp nie jest szczególnie obszerny, ale daje dobrą podstawę teoretyczną dla zrozumienia pozostałych części rozprawy. W zakresie merytorycznym mam do tej części pracy następujące uwagi:

1. Uwagę dotyczącą informacji znajdującej się na stronie siódmej, wg. której fagi zawierające jednoniciowe RNA obejmują zarówno takie o polarności dodatniej jak i polarności ujemnej. Według mojej najlepszej wiedzy do tej pory nie zostały zidentyfikowane żadne fagi RNA z nicią o polarności ujemnej. Jeśli znalazły się wśród najnowszych odkryć, to powinny zostać wymienione w pracy, szczególnie w tabeli nr 1, w której znajdujemy jedynie *Leviviridea* (ssRNA(+)).
2. Uwagę dotyczącą opisu powstawania kapsydu fagowego (str. 14)- warto byłoby go uzupełnić o fazę dojrzewania, która nie została wspomniana, a która jest kluczowa u niektórych fagów, w tym u wspomnianego faga T4. Obejmuje ona tzw. dojrzewanie proteolityczne oraz inkorporację białek dekoracyjnych, modulujących interakcje bakteriofaga z otaczającym go środowiskiem.
3. Nie jest jasne, dlaczego w opisie mechanizmów oporności bakterii na fagi typu „restrykcja-modyfikacja” modyfikacja DNA przez metylazy znalazła się jako alternatywa dla trawienia DNA fagowego przez enzymy restrykcyjne. W dalszej części opisano zgodnie z prawdą, że metylacja ma rolę ochronną dla fagowego DNA (zatem odwrotną niż restrykcja). Zatem trudno byłoby uznać metylację za mechanizm przyczyniający się do ochrony bakterii przed fagami.

Pod względem edytorskim rozdział *Wstęp* jest przygotowany na akceptowalnym poziomie, ale zawiera dość liczne błędy literowe, językowe (na przykład „potwierdza twierdzenie” na str. 25, „polegającego na poprzez niszczeniu” na str. 18), a nawet



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

ortograficzny („nie mniej” na stronie 26 powinno mieć pisownię łączną). Poza tym wszystkie rysunki są opisane jako „figury” i tak cytowane w tekście rozprawy. Wydaje się, że właściwe byłoby jednak użycie polskiego słowa „rysunek” lub tradycyjnie „rycina”, natomiast użyta forma „figura” została przeniesiona wprost z języka angielskiego i nie jest poprawna w wypadku pracy pisanej w języku polskim. Ta uwaga dotyczy całego tekstu rozprawy, ponieważ „figura” jako określenie rysunku pojawia się także w innych rozdziałach. Same rysunki są bardzo starannie przygotowane, są też estetyczne i dobrze wspierają zrozumienie omawianych we wstępie treści.

Rozdział *Cel pracy* obejmuje około jednej strony opisu i przedstawia uzasadnienie dla przeprowadzonych badań, odwołując się do wielolekooporności bakterii jako narastającego w skali globalnej problemu oraz do bakteriofagów i białek fagowych jako potencjalnego źródła terapii alternatywnych dla antybiotykoterapii. Zawiera też krótkie uzasadnienie wybranego przedmiotu badań, jakim są fagi atakujące *Burkholderia cepacia* i *Klebsiella pneumoniae*. Niestety sam cel pracy został przedstawiony raczej jako lista wykonanych zadań i założeń. Układają się one w pewną całość, wskazując na porównanie obecności profagów w badanych szczepach bakteryjnych, ocenę zależności od środowiska bytowania, analizę organizacji wybranych genomów fagowych. Podano też pewną liczbę celów określonych jako cele dodatkowe. Jednak bardzo brakuje mi sformułowanego wprost głównego celu badawczego i hipotezy badawczej, które moim zdaniem powinny być w pracy doktorskiej jasno określone.

Rozdział *Materiały i metody* może w pracy o charakterze bioinformatycznym stanowić spore wyzwanie. Klasyczne protokoły laboratoryjne mają bowiem niezupełnie przystający do tego typu pracy format i rolę. Pan mgr Roszniowski zmierzył się z tym wyzwaniem umieszczając obszerne opisy poszczególnych metod i narzędzi, kładąc nacisk na wyjaśnienie w jaki sposób działają i do jakich zastosowań mogą być wykorzystywane. Jest to cenny element pracy. Zastosowane metody są adekwatne i są aktualne, co również stanowi wyzwanie w przypadku błyskawicznie się rozwijającego i zmieniającego obszaru, jakim jest analiza bioinformatyczna. Uważam, że na docenienie zasługuje dbałość o wiarygodność



uzyskiwanych wyników, która skłoniła Doktoranta aby poza prostymi metodami anotacji automatycznej dokonał jej tzw. ręcznej weryfikacji, co znacznie podniosło jakość przeprowadzonej analizy. Ponadto należy docenić fakt, że przeprowadzone analizy zostały częściowo wykorzystane do uaktualnienia danych udostępnionych w bazie GenBank.

Do tego rozdziału mam następujące uwagi:

1. W treści pracy znalazłam odwołania do narzędzi, których nie znajduję w rozdziale *Materiały i metody*, są to CoreGenes 3.5, CRISPRfinder, ARAGORN, oraz ClustalOmega (w ostatnim przypadku podano odniesienie do innej wersji narzędzia z tej rodziny czyli ClustalW)
2. Na stronie 40. znalazła się informacja, że „do sekwencji kodujących zalicza się geny (...), sekwencje regulatorowe oraz inne elementy (...)”. Jest to stwierdzenie błędne, ponieważ typowe sekwencje regulatorowe jak promotory czy enhancery nie są sekwencjami kodującymi.
3. Na podstawie przedstawionego opisu nie jest jasne jak prowadzono eliminację niekompletnych lub wątpliwych ORF (str. 43), wartościowe byłoby rozwinięcie tego punktu.
4. Na stronie 52. znajdujemy informację, że terminator powinien zawierać minimum 4 nukleotydy tworzące pętlę, natomiast na rysunku 8. drugi przykład terminatora zawiera 3 takie nukleotydy. Skąd ta rozbieżność?
5. Miejsce startu transkrypcji to „transcription start site” czyli TSS, a nie jak podano w pracy kilkakrotnie na stronie 45. „TTS”. TTS jest skrótem właściwym dla miejsca terminacji transkrypcji: „transcription termination site”.
6. Tytuł podrozdziału nr 4.2.6.2 ma zupełnie inną formę niż wszystkie pozostałe tytuły zastosowane w tej części, niepasującą do przyjętej konwencji.
7. Odsyłacze zawarte w rozdziale *Materiały i metody* zawierają błędy lub nieścisłości. Na stronie 52 znajdujemy odsyłacz do „Ryciny X”. Na stronie 54 jest informacja o danych załączonych w formie załączników 1 i 2 – nie znajduję takich załączników w pracy.
8. Rozdział *Materiały i metody* zawiera niestety bardzo liczne omyłki literowe, interpunkcyjne i językowe, a także niedokończone linijki tekstu przeniesione do



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

następnej linii (str. 33 i 44). Niektóre z nich powodują trudności ze zrozumieniem tekstu, a nawet niezgodności merytoryczne, jak nazwa miejsca wiązania rybosomów, która poprawnie powinna brzmieć Shine-Dalgarno (str. 42). Uważam też, że w pracy naukowej powinna być stosowana jednolita nomenklatura i sposób zapisu, tymczasem w tej pracy występują na zmianę różne wersje. Skrót dla powyższej nazwy to albo SD albo S-D, nazwy narzędzi to BLASTn lub blastn, Pfam/pfam/*Pfam/pfam*. Zupełnie losowo jest też stosowane określenie anotacja i adnotacja.

Wyniki przedstawione w pracy dotyczą zarówno unikalnego bakteriofaga AP3, wyizolowanego w ramach prac zespołu Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii, jak i sekwencji o charakterze profagów lub potencjalnych profagów, które zidentyfikowano w bazach danych. Na docenienie zasługuje fakt, że wyniki prac dotyczących bakteriofaga AP3 zostały opublikowane w piśmie *Applied Microbiology and Biotechnology* (2017) a Doktorant pełni w tej publikacji rolę pierwszego autora. Charakterystyka genomu faga pozwoliła na identyfikację elementów genetycznych (szczegółowe dane zawarto w tabeli nr 7).

Bardzo interesująca jest identyfikacja i charakterystyka profagów zidentyfikowanych w genomach bakteryjnych. Zaskoczyła mnie spora liczba sekwencji fagowego pochodzenia, które udało się zidentyfikować. Ich analiza wskazuje zaś na aktywne „udomawianie” bakteriofagów przez ich gospodarzy. Sugeruje także, że fagi te mogą się przyczyniać do przenoszenia do genomu gospodarza genów oporności na związki przeciwbakteryjne.

W części poświęconej fagom *Klebsiella* znajdujemy obserwacje wskazujące na różnice w liczbie promotorów i terminatorów, występujące pomiędzy dwoma badanymi blisko spokrewnionymi fagami. Zaproponowano ciekawe wyjaśnienia możliwego mechanizmu powstania tych różnic. Mam nadzieję, że zostaną w przyszłych badaniach zweryfikowane. W tej części znajdujemy także bardzo dobrze opracowane graficzne prezentacje genomów fagowych. Przeprowadzono też analizę występowania, przynależności taksonomicznej i czynników wirulencji u profagów. Przyporządkowano taksonomicznie imponującą liczbę regionów, które poprzednio pozostawały nieokreślone. Wykryto też występowanie pięciu typów potencjalnych



czynników wirulencji. Jest to bardzo porządnie wykonana analiza, obejmująca pokrewieństwa sekwencji, stanowiąca bardzo ciekawą część pracy.

Do rozdziału *Wyniki* mam następujące pytania i uwagi:

1. Na stronie 66 znajdujemy informację o zlokalizowaniu czterech promotorów gospodarza. Ze względu na ich specyficzne położenie zdaniem Doktoranta jest prawdopodobne, że obejmują one transkrypcję genów wczesnych, środkowych i późnych. Niestety nie wyjaśniono o jakie konkretnie położenie chodzi. Jest też zastanawiające, dlaczego promotory gospodarza miałyby być efektywne w wypadku genów późnych.
2. Skoro profagi wydają się najczęstsze w chromosomie nr 1, interesująca dla czytelnika byłaby informacja na jakiej zasadzie chromosomy badanych szczepów bakteryjnych są numerowane. Czy jest to wyłącznie kwestia historyczna/tradycyjna, oparta na homologii do pierwszych sekwencjonowanych izolatów?
3. Zidentyfikowano sekwencje CRISPR. Ciekawa byłaby informacja o ewentualnych homologiach pomiędzy sekwencjami protospacerów a sekwencjami zidentyfikowanych w tych genomach profagów. Czy były badane?
4. Na stronie 66 znajdujemy informację, że sekwencje użyte do porównania obejmowały wirusy wykazujące co najmniej 85% podobieństwa, wraz z odsyłaczem do tabeli nr 9. Jednak w tabeli wszystkie poziomy podobieństw są znacznie niższe: największe to 61,9% (przeważają takie poniżej 50%).
5. Metoda „WGS” to „whole genome sequencing” a nie “whole genome shotgun” (str. 68)
6. Na stronie 73 znajdujemy informację, że „BCC reprezentuje grupę bakterii, których genom podzielony jest na dwa lub trzy chromosomy”, podczas kiedy tabela nr 5 wymienia również taki szczep, który ma jeden chromosom.
7. Wyjaśnienia, a może korekty, wymaga opis mechanizmu integracji faga AP3. Rekombinacje nie zachodzą bowiem pomiędzy attP oraz attL, a pomiędzy attP a attB, natomiast sekwencja attL jest produktem tej rekombinacji. Zastanawiające jest też, że miejsce rekombinacji (czyli fragment DNA) jest nazywana „integrazą”, co jest zwyczajową nazwą enzymu pośredniczącego w całym procesie. Czy należy rozumieć, że zachodząca rekombinacja dzieli (jak opisano w pracy) gen kodujący enzym integrazę?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

8. Niestety również w tym rozdziale występują liczne omyłki o charakterze literówek, powtórzeń i drobnych błędów językowych, w tym powtórzeń, błędnej odmiany lub nieodpowiednich przyimków. Warto pamiętać o tym, że słowo „ilość” powinno być stosowane w wypadku rzeczowników niepoliczalnych, natomiast do policzalnych (jak fagi, geny, promotory itp.) powinno się stosować „liczba”. Znajdujemy też powtórnie błąd polegający na rozłącznej pisowni „nie mniej” (str. 94) oraz przestrzeni „między genowej”, a także pewną liczbę błędów interpunkcyjnych. Odsyłacze nie mają jednolitego formatu: słowa „tabela” i „figura” są pisane wielką lub małą literą, zdarzył się także skrót „Fig.”. Nazwy anglojęzyczne są pisane w różnym formacie: kursywą lub pismem zwykłym, wielkimi literami lub małymi literami. Niektóre skróty, jak „BCC” są rozszyfrowywane po raz drugi pomimo, że były już zidentyfikowane w poprzednich rozdziałach. Tabele nr 9 występują dwie: na stronie 67 i na stronie 69. Na stronie 73 znajduje się odsyłacz do tabeli nr 2, podczas kiedy tekst wskazuje, że chodzi o tabelę nr 10. Część rysunków nie ma w legendzie informacji co do znaczenia poszczególnych kolorów, jakie zastosowano w grafice. W kilku miejscach występują niedokończone i przeniesione linijki tekstu.

Dyskusja ma w tej pracy nietypową formę, ponieważ na końcu każdej z tematycznych części *Wyników* znajdujemy dotyczącą ich dyskusję, a następnie odrębny rozdział *Dyskusja*. Sam rozdział *Dyskusja* jest bardzo okrojony (4 strony), ale łącznie z poprzedzającymi go podrozdziałami *Wyników* stanowi dość kompletne podsumowanie i pozwala ulokować przedstawione w pracy obserwacje na „mapie” współczesnego stanu wiedzy o bakteriofagach. Zastosowano właściwe odniesienia literaturowe, a także porównano obserwacje dotyczące różnych gospodarzy bakteryjnych. Zaproponowano przekonujące wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów zaobserwowanych prawidłowości, odnosząc się do ekologii i biologii gospodarzy badanych fagów. Szczególnie ciekawa jest w mojej opinii część poświęcona systemowi sekrecji typu VI (T6SS) jako czynnikowi wirulencji- przedstawiono krytyczną analizę jego znaczenia biologicznego i pochodzenia. Do tego rozdziału nie mam istotnych uwag, poza tym, że:



1. jest to rozdział, w którym należałoby jasno wskazać ograniczenia zastosowanych metod i wynikające z nich ograniczenia co do możliwego wnioskowania i interpretacji otrzymanych wyników
2. występują w nim również omyłki literowe i językowe, podobnie jak w poprzednich częściach pracy

Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą stwierdzam, że mimo wskazanych niedociągnięć występujących głównie w warstwie edycyjnej i językowej, zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Przeprowadzone badania dowodzą umiejętności w zakresie analiz bioinformatycznych, a jednocześnie wskazują na zdolność do wyszukiwania powiązań pomiędzy prawidłowościami identyfikowanymi przez narzędzia bioinformatyczne, a bardziej ogólnymi prawami biologicznymi mogącymi mieć znaczenie praktyczne.

Stwierdzam, że Doktorant wykonał ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą oryginalny wkład w zrozumienie występowania i biologicznej roli profagów w szczepach bakterii o znaczeniu klinicznym. Rozprawa została napisana zrozumiale, a zauważone błędy nie przekreślają jej naukowej wartości. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia w mojej ocenie wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysockiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Bartosza Roszniowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska