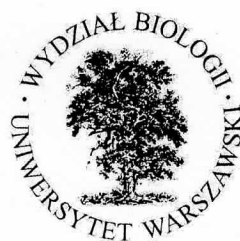




UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii Molekularnej
dr hab. Adrianna Raczkowska



Warszawa, dn. 12.10.2021

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Bartosza Roszniowskiego

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza Roszniowskiego została wykonana w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem i opieką naukową promotora prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy. Tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgr. Bartosza Roszniowskiego jest kontynuacją badań realizowanych przez zespół Pani Profesor, które dostarczają wiele oryginalnych i wartościowych danych dotyczących biologii i genetyki bakteriofagów. Biorąc pod uwagę zarówno niezmiernie ważną rolę ekologiczną odgrywaną przez bakteriofagi, jak również ogromne zainteresowanie tymi wirusami ze względu na możliwość zastosowania w biotechnologii oraz medycynie, poznanie nieopisanych dotąd fagów jest bardzo istotnym celem naukowym.

Pan mgr. Bartosz Roszniowski podjął się w pracy genetycznej charakterystyki fagów namnażających się w szczepach *Burkholderia cenocepacia* oraz *Klebsiella pneumoniae*, które Doktorant zaklasyfikował odpowiednio jako szczepy środowiskowe (*B. cenocepacia*) oraz kliniczne (*K. pneumoniae*). Praca doktorska ma klasyczny, typowy układ dla rozpraw z dziedziny biologii. Rozpoczyna się obszernym Wstępem, w którym Doktorant przedstawił klasyfikację taksonomiczną bakteriofagów oraz szczegółowo opisał cykle życiowe bakteriofagów i mechanizmy oporności bakterii na infekcje fagowe. Omówił także wyczerpująco rolę bakteriofagów w horyzontalnym transferze genów, uwzględniając również ich wpływ na środowisko i ewolucję mikroorganizmów.

Wstęp Autor kończy charakterystyką bakterii *Burkholderia cenocepacia* i *Klebsiella pneumoniae*, których bakteriofagi były obiektem badań. Wstęp jest napisany bardzo dobrze w oparciu o dogłębnie przeanalizowane źródła literaturowe. Pojawiające się błędy literowe czy stylistyczne nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Należy też podkreślić, że wszystkie przedstawione w tej części pracy informacje przydały się podczas analizy omówionych w rozprawie wyników Doktoranta.

Celem rozprawy doktorskiej Pana mgr. Bartosz Roszniowski było: (i) porównanie (ilościowe i jakościowe) genomów różnych szczepów obu analizowanych gatunków bakterii, pod kątem obecności profagów, (ii) weryfikacja hipotezy o tendencji do agregacji wirusów łagodnych lub ich elementów, w zależności od ich środowiska bytowania, (iii) poznanie organizacji genomów profagowych, ze szczególnym uwzględnieniem genów kodujących potencjalne czynniki zjadliwości, jak również białka sprzyjające adaptacji gospodarza do warunków bytowania oraz posiadające potencjał terapeutyczny. Kolejnym ważnym zadaniem jakie postawił przed sobą Pan mgr Bartosz Roszniowski była bioinformatyczna charakterystyka sekwencji genomowych bakteriofagów AP3, KP15 oraz KP27, znajdujących się w kolekcji grupy badawczej prof. Z. Drulis-Kawy. Autor wskazał również dodatkowy cel pracy, którym było opracowanie optymalnej metodologii, która zwiększyłaby efektywność analiz *in silico* podejmowanych w tego typu projektach badawczych.

W rozdziale Materiały i Metody Autor skrupulatnie opisał przebieg badań i narzędzi bioinformatycznych, które posłużyły do ich przeprowadzenia. Bardzo szczegółowa lista zastosowanych programów i precyzyjne omówienie ich możliwości pozwalają na odtworzenie przebiegu analiz i równocześnie stanowią cenne kompendium wiedzy na temat prowadzenia efektywnych analiz *in silico* w celu identyfikacji i charakterystyki genomów wirusowych.

Najobszerniejszą część ocenianej pracy stanowią wyniki własne Doktoranta, z których przeważająca część została już opublikowana w renomowanych anglojęzycznych czasopismach. W dwóch publikacjach Pan mgr Bartosz Roszniowski jest pierwszym autorem [Roszniowski, B., Łątka, A., Maciejewska, B., Vandenheuvel, D., Olszak, T., Briers Y., Holt GS., Valvano MA., Lavigne, R., Smith, DL., Drulis-Kawa Z. 2017. The temperate *Burkholderia* phage AP3 of the *Peduvirinae* shows efficient antimicrobial activity against *B. cenocepacia* of the IIIA lineage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 1203–1216; Roszniowski B., McClean S., Drulis-Kawa Z. 2018. *Burkholderia cenocepacia* prophages - prevalence, chromosome location and major genes involved. *Viruses*, 10(6), 297], w trzeciej zaś drugim autorem [Maciejewska B., Roszniowski B., Espaillat A., Kęsik-Szeloch A., Majkowska-Skrobek G., Kropinski A.M., Briers Y., Cava F., Lavigne R., Drulis-Kawa Z. 2017. *Klebsiella* phages representing a novel clade of viruses with an unknown DNA

modification and biotechnologically interesting enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 673].

Autor w swojej dysertacji przeprowadził szczegółową charakterystykę genomu bakteriofaga AP3 *Burkholderia cenocepacia*, jak również bakteriofagów KP15 i KP27 *Klebsiella pneumoniae*. Przeprowadzona analiza umożliwiła stworzenie precyzyjnych map genomowych wraz z odpowiednimi tabelami anotacji sekwencji kodujących i niekodujących. Dodatkowo wykonał porównanie organizacji genomów tych bakteriofagów z genomami innych fagów pokrewnych.

Kolejne badania Doktoranta miały na celu określenie występowania, lokalizacji i charakterystyki profagów specyficznych wobec dwóch analizowanych bakteryjnych gospodarzy. We wszystkich 16 analizowanych genomach *B. cenocepacia* wykryto 63 potencjalne sekwencje profagowe. Natomiast w 139 analizowanych genomach *K. pneumoniae* brak sekwencji charakterystycznej dla bakteriofagów stwierdzono w 12 szczepach, zaś w pozostałych 127 wykryto 79 potencjalnych sekwencji profagowych. Autor wskazał też te sekwencje profagowe, które mogą składać się na kompletny genom potencjalnych cząstek wirusowych. Zidentyfikowane liczne, niekompletne sekwencje profagowe mogą natomiast świadczyć według Autora o zdolności szczepów *B. cenocepacia* do udomowienia profagów, co zapewnia dodatkową pulę genów potencjalnie przydatnych dla tej bakterii. Przeprowadzona przez Doktoranta analiza sekwencji profagowych pod kątem występowania potencjalnych genów wirulencji, wykazała obecność m.in. genów systemu sekrecji typu VI (T6SS), toksyna-antytoksyna, autotransporterów, lekooporności czy systemów pobierania żelaza. W przypadku fagów łagodnych *K. pneumoniae* największą grupę czynników zjadliwości stanowiły systemy sekrecji (T6SS), natomiast najczęstszymi, wykrywanymi obcymi genami w sekwencji profagów *B. cenocepacia* były te kodujące transportery należące do rodziny MFS, warunkujące lekooporność bakterii.

Pomimo wysiłku jaki niewątpliwie Doktorant włożył w opracowanie wyników, to wyraźnie odczuwam brak danych pochodzących z klasycznych prac eksperymentalnych, które niewątpliwie wzbogaciłyby treść pracy i przyniosły dużo interesujących informacji. Myślę chociażby o zbadaniu właściwości biologicznych charakteryzowanych fagów AP2, KP15 i KP27, tj. określenie zakresu ich gospodarzy, efektywności adsorpcji do komórek gospodarza, czy też stabilności wobec różnych czynników fizykochemicznych. Ciekawym byłoby również podjęcie próby indukcji profagów, wizualizacji cząstek fagowych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej czy też analiza funkcjonalna w gospodarzu heterologicznym wybranych modułów genetycznych zidentyfikowanych w fagach. Czy tego typu badania są planowane?

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402
e-mail: ad.raczkowska@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Czytając wyniki napotkałam kilka niefortunnych sformułowań. Opisując zidentyfikowane czynniki zjadliwości Autor stwierdza, cytując: „System sekrecji typu VI (T6SS) składa się z ułożonych obok siebie białek (do 21) i pośredniczy w antagonistycznych interakcjach pomiędzy różnymi gatunkami bakterii Gram-ujemnych” oraz, cytując: „... konserwatywny *gtrB*, który bierze udział w unikaniu odpowiedzi immunologicznej”. Przypuszczam, że są to swego rodzaju skróty myślowe, których jednakże należałoby się wystrzegać w pracach naukowych. Kolejna uwaga dotyczy zidentyfikowanego genu *iroE*, który według Autora koduje salmochelinę. Autor pisze, cytując: „Podobnie jak w przypadku enterobaktyny, salmochelina uważana jest za białko o największym znanym powinowactwie do jonów żelaza”. Zarówno enterobaktyna, jak i salmochelina to siderofory katecholowe, natomiast gen *iroE* wchodzi w skład obszernego locus *iroBCDEN*, kodującego białka odpowiedzialne za glikozylację enterobaktyny do salmocheliny, jak również pobieranie tego sideroforu w kompleksie z żelazem. Chciałabym jednak podkreślić, że obecność tych błędów w pracy pozostaje bez wpływu na moją pozytywną ocenę całej rozprawy doktorskiej.

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały szczegółowo skonfrontowane z danymi literaturowymi w Dyskusji. Dobrym pomysłem było rozdzielenie tego rozdziału pracy na dwie niezależne dyskusje dotyczące wyników uzyskanych dla poszczególnych bakteryjnych gospodarzy, jak również przedstawienie ostatecznego podsumowania. Chciałabym zaznaczyć, że każdy aspekt wyników został w Dyskusji dogłębnie omówiony. Autor porównał omawiane patogeny pod względem ilościowej i jakościowej obecności profagów. Z dużym zainteresowaniem czytałam tę część rozprawy i chciałabym podkreślić dojrzałość naukową Doktoranta i znajomość problematyki związanej z biologią bakteriofagów.

Należy również podkreślić, że dużą część rozprawy doktorskiej stanowią materiały uzupełniające zawierające liczne tabele i figury, które dopełniają informacje zawarte w pracy. Stanowią one obszerne źródło danych dla szczegółowej charakterystyki genomów opisanych bakteriofagów.

Czytając pracę nasunęło mi się kilka pytań, proszę o ustosunkowanie się do nich Doktoranta:

1. Jak skomentowałby Pan brak sekwencji profagowych w 12 analizowanych genomach *K. pneumoniae*? Czy nie wynika to przypadkiem z zastosowanego narzędzia bioinformatycznego? A może te szczepy posiadają jakieś szczególne mechanizmy oporności na infekcje fagowe?
2. Który spośród zidentyfikowanych profagów byłby najciekawszym obiektem dalszych badań według Doktoranta?
3. Jakie zastosowanie praktyczne mogą mieć wyniki uzyskane w ramach tej rozprawy doktorskiej?

Podsumowując, pomimo uwag wyrażam duże uznanie dla osiągnięć Pana mgr. Bartosza Roszniowskiego. Przedstawione w rozprawie analizy *in silico* z pewnością były czasochłonne, a obszerna pula otrzymanych danych wymagała od Doktoranta dużych umiejętności analitycznych w celu ich właściwej interpretacji. Dlatego uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wnosi oryginalny wkład do bardzo ważnego obszaru wiedzy jakim jest wirusologia. Autorowi udało się bowiem w pracy przedstawić nowe, ważne treści, które potwierdzają koewolucję bakteriofagów i ich gospodarzy, a także wskazują na istotną rolę profagów w nabywaniu wirulencji bakterii.

Na zakończenie uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz.595 z póź. zm.) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia. Zatem, wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr. Bartosza Roszniowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Adrianna Raczkowska

