



SPOŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

Łódź, 27.03. 2015

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie

Prof. zw. Społecznej Akademii Nauk w Łodzi

90 - 113 Łódź, ul Sienkiewicza 9

tel: 607-356-5777

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl

**Ocena pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza zatytułowanej
„Charakterystyka struktury wyspy patogenności szczepu
Yersinia enterocolitica 1B/08, występującego na terenie Polski,
ze szczególnym uwzględnieniem genów regulatorowych *ysrR-ysrS***

1. Temat i cele pracy

Praca doktorska mgr Tomasza Wołkowicza została zrealizowana w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego - w Państwowym Zakładzie Higieny pod kierunkiem dr hab. Rafała Gierczyńskiego. Praca ma postać starannie opracowanej monografii w układzie typowym dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych; obejmuje bowiem sześć logicznie uporządkowanych rozdziałów, to jest *Wstęp.*, *Założenia i Cel pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, zwarte 4-stronicowe *Streszczenie*, opracowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim oraz *Piśmiennictwo*, zawierające spis 228 pozycji cytowanej literatury.

Obiektem badań mgr Tomasza Wołkowicza stały się pałeczki *Yersinia enterocolitica* 1B/08, które (jak pisze w założeniach swojej pracy doktorskiej) stanowią od kilku lat istotny czynnik etiologiczny jersiniozy w Polsce. Co bardzo ciekawe, izolowane w Polsce szczepy należą, co prawda, do bioserotypu 1B/08, ale prawdopodobnie jako odmienny genetyczny klon - charakteryzują się, po pierwsze bardzo wysokim pokrewieństwem filogenetycznym, i po drugie, defektem w systemie T3SS *Ysa*, odpowiedzialnym za sekrecję patogennych białek *Ysp*, które są znanymi czynnikami wirulencji dla wysoce chorobotwórczych pałeczek *Yersinia . enterocolitica*. zaliczanych do bioserotypu 1B/08.

Stąd, sformułowany cel pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza, to jest poznanie różnic w organizacji i funkcji wyspy patogenności *Ysa* epidemicznego szczepu/ klonu *Y. enterocolitica* 1B/08, krążącego w Polsce, oraz homologicznych loci *Ysa* w genomach odmiennych szczepów tego bioserotypu - należy uznać za bardzo interesujący z racji poznawczych i ważny z racji dochodzeń epidemiologicznych zakażeń pałeczkami *Yersinia enterocolitica*. Należy podkreślić, że w literaturze światowej brak jest danych na temat

organizacji i funkcji systemu T3SS Ysa w genomach szczepów *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08 współcześnie izolowanych od ludzi z objawami jersiniozy.

Zasadniczym obiektem badań był szczep *Y. enterocolitica* 1B/08 o numerze DM0110, który został wyizolowany w Polsce od dwuletniego dziecka z biegunką w 2005 roku. Genotypowanie tego szczepu ujawniło jego wysokie genetyczne podobieństwo do innych izolatów *Y. enterocolitica* 1B/08 wyodrębnionych w Polsce w latach 2004-2009, opisanych w pracach Gierczyńskiego i wsp. (*J. Clin. Microbiol.* 2009) i Zacharczuka (*Praca doktorska*, 2013). Zgromadzona w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH kolekcja 148 szczepów *Yersinia enterocolitica* 1B/08, wyizolowanych w Polsce w latach 2004-2013, była dla Doktoranta znakomitym materiałem dla szerszych badań porównawczych i populacyjnych. Zaś szczep referencyjny *Y. enterocolitica* WA-314 i 10 innych szczepów bioserotypu 1B/08 tego gatunku, nie powiązanych ze sobą epidemiologicznie, stanowiły bardzo dobrze zaplanowaną grupę kontrolną. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem przedstawione w *Wstępie* pracy doktorskiej dane na temat historii rozproszonych ognisk zakażeń *Y. enterocolitica* 1B/08 w Polsce od 2004 roku, kiedy to po raz pierwszy wyizolowano pałeczki należące do tego bioserotypu. W tym kontekście mogę stwierdzić, że temat i cele pracy doktorskiej Pana mgr Tomasza Wołkowicza mieszczą się w jednym z głównych kierunków owocnych badań poznawczych Zespołu dr hab. Fafała Gierczyńskiego.

Kierunkowym celem pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza było poznanie przyczyny inaktywacji systemu sekrecji T3SS Ysa w epidemicznym szczepie *Yersinia enterocolitica* 1B/08 DM0110, a w konsekwencji opracowanie molekularnego testu, który pozwoliłby na selekcję możliwie dużej liczby takich szczepów/klonów z kolekcji zgromadzonej w NIZP-PZH, a następnie ustalenie na poziomie sekwencji nukleotydowej ich genomów molekularnej przyczyny dysfunkcji systemu sekrecji T3SS Ysa.

*Nie mam wątpliwości, że w tym ujęciu sformułowany cel pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza stał się oryginalnym projektem badawczym, bowiem podobnego zjawiska nie opisano dotychczas dla szczepów *Y. enterocolitica* 1B/08 izolowanych współcześnie od ludzi, a jedynie dla laboratoryjnych szczepów poddanych mutagenzie.*

Odpowiedzi na postawione pytanie poszukiwano poprzez realizację bardzo dobrze zaplanowanych celów cząstkowych, to jest:

- sklonowanie w wektorze plazmidowym i zsekwencjonowanie zamplifikowanego regionu genomowego DNA, pokrywającego cały locus Ysa-PI epidemicznego szczepu *Yersinia enterocolitica* 1B/08, o numerze DM0110
- bioinformatyczną analizę sekwencji nukleotydowej tego regionu DNA, poprzez porównanie jej z sekwencją szczepu referencyjnego *Y. enterocolitica* 1B/08 WA-314
- analizę transkryptomu (RT-PCR) w celu zbadania poziomu transkrypcji genów, regulatorowych oraz genów kodujących białka systemu Ysa,
- zbadanie poziom ekspresji i ustalenie wielkości białka regulatorowego YsaR.

W praktyczną realizację tych ambitnych etapowych badań wprężnięto właściwie, bardzo dobrane, nowoczesne metody i techniki molekularne, genetyczne oraz bioinformatyczne, które dokładnie, powiedziałbym bardzo skrupulatnie, opisano na 32 stronach w rozdziale *Materiały i Metody*. Stąd, przedstawione w pracy doktorskiej wyniki, uzyskane przy zastosowaniu opisanych metod, technik i procedur analitycznych - należy uznać za w pełni wiarygodne.

2. Część teoretyczna pracy (Wstęp)

W obszernym *Wstępie*, opracowanym w postaci 6 logicznie uporządkowanych podrozdziałów mgr Tomasz Wołkowicz przedstawił z dużym znanstwem dane, obficie cytowanej literatury światowej (228 pozycji), na temat charakterystyki pałeczek *Yersinia*

enterocolitica, to jest filogenezy, diagnostyki, epidemiologii zakażeń w świecie i w Polsce, obrazu klinicznego jersiniozy oraz patogenezy. Najobszerniejszy rozdział, ściśle związany z tematem i celami pracy doktorskiej, poświęcono czynnikom wirulencji *Yersinia enterocolitica*, w tym organizacji i funkcji systemów transportu typu III Ysc, III Ysa, T2SS Yst1 i Yst2, a także roli innych czynników wirulencji tych bakterii, takich jak: adhezyny, enterotoksyny, fimbrie Myf, jersiniabaktyna (Ybt), fosfolipaza A (YplA).

Chciałbym podkreślić, że *Wstęp*, podobnie jak cała praca doktorska, zostały napisane poprawnym językiem naukowym i ładną polszczyzną. Mam jedynie pewne uwagi do niektórych stwierdzeń zawartych w pierwszej części *Wstępu*, nazwanej przez Doktoranta *Wprowadzeniem*. I tak, zgodnie z moją wiedzą organizm człowieka zbudowany jest z około 10^{13} somatycznych i rozrodczych komórek, a zasiedla go 10 razy większa populacja komórek mikroorganizmów (10^{14}), należących do ponad 500 gatunków zwanych mikrobiomem (ang. *microbiota*). Szacuje się, że liczba genów mikroorganizmów ludzkiego mikrobiomu w organizmie człowieka jest 50-100 razy większa niż liczba jego własnych genów (około 23 tysiące). Doktorant pisze natomiast, że organizm człowieka składa się z milionów komórek tworzących tkanki i organy, a zasiedlają go miliardy bakterii. Ponadto, Doktorant pisze o bardzo dużej zmienności czasowej mikrobiomu człowieka, związanej, jak pisze, „z faktem ciągłego dostarczania z pożywieniem kolejnych porcji mikroorganizmów”. W świetle znanych mi bardzo wielu pozycji światowej literatury, w tym znakomitych prac z ostatnich lat, wyżej cytowane stwierdzenia, jako błędne lub zbyt lakoniczne, winny zostać usunięte albo skorygowane.

Wyniki

W pierwszej części tego rozdziału Doktorant przedstawił w pełni udokumentowane wyniki na temat bioinformatycznej analizy sklonowanej sekwencji nukleotydowej (30.379 par zasad) wyspy patogenności Ysa epidemicznego szczepu *Y. enterocolitica* DM01110, w porównaniu z wyspą patogenności Ysa referencyjnego szczepu WA-314 i dwóch innych szczepów kontrolnych należących do bioserotypu 1B/08. Okazało się, że wyspa patogenności epidemicznego szczepu *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08 krążącego w Polsce, jest kompletna i charakteryzuje się bardzo wysokim stopniem podobieństwa zarówno na poziomie sekwencji nukleotydowej, jak i aminokwasowej kodowanych białek, do wyspy patogenności Ysa zarówno szczepu referencyjnego, jak też dwóch innych, nie powiązanych epidemiologicznie szczepów *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08. Najistotniejszą wykrytą zmianą, charakterystyczną wyłącznie dla epidemicznego szczepu *Y. enterocolitica* DM0110, była substytucja cytozyny w pozycji 269 na adeninę w genie kodującym syntezę białka regulatorowego YsrR. Mutacja ta skutkuje zmianą kodonu TCA, kodującego serynę na kodon ochre (TAA), będący sygnałem STOP dla procesu translacji. W efekcie odkrycia tej mutacji postawiono hipotezę, że syntetyzowane białko regulatorowe YsrR w epidemicznym w Polsce szczepie DM 0110 zostaje skrócone z 237 do 89 aminokwasów. Analiza bioinformatyczna funkcji skróconego białka wykazała, że ekspresjonowana część białka YsrR obejmuje zaledwie połowę ważnej, funkcjonalnej domeny REC, w obrębie której znajduje się ważne miejsce fosforylacji, ale nie ma w niej wielu innych aminokwasów, tworzących aktywne miejsce domeny REC. Ponadto, białko to nie ma zdolności wiązania się do DNA, z powodu braku domeny z motywem HTH, znajdującej się na karboksylowym końcu białka, która jest charakterystyczna dla białek regulatorowych rodziny LuxR. Przedwczesny kodon STOP sprawia, że zarówno środkowy, jaki i końcowy fragment białka YsrR, nie jest syntetyzowany w komórkach epidemicznego w Polsce szczepu *Y. enterocolitica* 1B/08. Co więcej, wykryta mutacja w genie *ysrR*, kodującym nadrzędny regulator transkrypcji

operonów systemu T3SS Ysa, jest charakterystyczna dla wszystkich zbadanych 148 szczepów *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08, izolowanych w Polsce w ostatnich dziesięciu latach. Można więc powiedzieć, że w Polsce od 10 lat krąży jeden epidemiczny klon tego bioserotypu. Za bardzo dobry pomysł i ważny wynik pracy doktorskiej uznaję opracowanie przez Doktoranta szybkiego, czułego testu PCR-FFLP, z wykorzystaniem endonukleazy BtsI, jako bardzo przydatnego narzędzia zarówno dla szybkiej i pewnej identyfikacji tego epidemicznego w Polsce klonu, jak też dla ustalania źródeł i dróg jego horyzontalnej transmisji.

Przyznam, że do najmniej przekonujących, a nawet kontrowersyjnych wyników ocenianej pracy doktorskiej zaliczam rezultaty opisane w rozdziale 4.2 pt. *Analiza transkryptomu*. Przedstawione na rycinach 4.2.1, 4.3.2 i 4.4.3 wyniki analizy transkryptów dla 14 wybranych genów, leżących wewnątrz wyspy patogenności YSA-PI oraz 3 innych powiązanych z nią genów, leżących w innych miejscach chromosomu - praktycznie niczego nie wyjaśniają. Nie można dostrzec żadnych istotnych różnic ani w profilu ani w intensywności prążków, uzyskanych przy zastosowaniu jakościowej metody RT-PCR, pomiędzy szczepem DM0110 (niezdolnym do syntezy funkcjonalnego regulatorowego białka YsrR) i referencyjnym szczepem WA-314. Stoi to w sprzeczności z wynikami pracy opublikowanej w 2013 roku przez Rokosz-Chudziak i wsp. oraz z wynikami doniesienia prezentowanego w 2013 roku przez Rastawickiego i wsp. na specjalistycznym Sympozjum w Chinach, wskazujących, że szczepy *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08 izolowane w Polsce charakteryzują się całkowitym brakiem białek wydzielanych przez system T3SS Ysa. Stąd, płynie logiczny wniosek, że opisana mutacja w genie regulatorowym *ysrR* winna być odpowiedzialna za blokadę transkrypcji wszystkich operonów badanego systemu. Jak wyjaśnić, pogodzić te sprzeczne rezultaty? Przedstawione w bardzo dobrze napisanej *Dyskusji* sugestie Doktoranta, poparte także danymi literatury, o możliwości istnienia „cieknących” promotorów różnych genów bakterii, a stąd możliwości syntezy śladowych ilości transkryptów badanych w pracy operonów, ale ilości niewystarczających do efektywnej syntezy 20 różnych białek tworzących aparat T3SS Ysa - są teoretycznie uzasadnione, ale tylko jako prawdopodobne. Wyrażam w tym miejscu przekonanie, że wyjaśnienie tej kwestii na drodze dobrze zaplanowanych dalszych badań doświadczalnych jest warunkiem, by bardzo wartościowe wyniki, niezwykle interesującej pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza - mogły być opublikowane w jednym z „rankingowych” specjalistycznych czasopism naukowych.

Chciałbym zatem poprosić Doktoranta o podjęcie w czasie publicznej obrony pracy dyskusji z recenzentem na temat strategii dalszych badań, które pozwoliłyby na jednoznaczne wyjaśnienie diskutowanej kwestii. Osobiście uważam, że zastosowanie chociażby ilościowej metody RT-PCR lub PCR w czasie rzeczywistym, mogłoby potwierdzić Jego sugestię o „cieknących” promotorach badanych operonów i syntezie śladowych ilości poszczególnych transkryptów. Pytam, czy inne strategie, np. konstrukcja modelowych układów/ szczepów noszących wybrane geny systemu Ysa, sklonowane pod kontrolą regulatorowego genu *ysrR*, nie byłyby właściwe dla lepszego zrozumienia mechanizmu indukcji badanych operonów i ich nadrzędnej regulacji przez regulatorowe białko YsrR. Wreszcie, czy sklonowanie funkcjonalnej kopii genu *ysrR* do szczepu *Y. enterocolitica* DM0110 i przywrócenie dzikiego fenotypu *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/08 (to jest zdolności syntezy wszystkich białek systemu T3SS Ysa) byłoby zdaniem Doktoranta sposobem na uzyskanie bezpośredniego dowodu, potwierdzającego najważniejszy wniosek płynący z Jego pracy doktorskiej, dotyczący „genetycznej unikatowości” epidemicznego szczepu *Yersinia enterocolitica* bioserotypu 1B/08 krążącego od 10 lat w Polsce.

Wnioski końcowe

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Tomasza Wołkowicza, w tym szczególnie mojego uznania dla wartości uzyskanych, oryginalnych wyników o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny - o dopuszczenie mgr Tomasza Wołkowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o wyróżnienie tej bardzo dobrze zaplanowanej pracy doktorskiej, zrealizowanej przy zastosowaniu nowoczesnego warsztatu badawczego z dwóch powodów. Po pierwsze, tematykę badawczą i uzyskane rezultaty uznaję za oryginalne w skali światowej. Po drugie, część wyników ocenianej pracy doktorskiej zostanie wkrótce opublikowana w pracy w czasopiśmie Polish Journal of Microbiology, a inne, po dodatkowych badaniach, mają, moim zdaniem, realną szansę na upowszechnienie w międzynarodowym obiegu naukowym - w postaci publikacji w jednym z „rankingowych” czasopism z listy JCR.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Wołkowicz', written in a cursive style.