

OCENA

rozprawy doktorskiej

Pana magistra Tomasza Wołkowicza p.t.

„Charakterystyka wyspy patogenności Ysa-Pl epidemicznego szczepu *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 występującego na terenie Polski ze szczególnym uwzględnieniem genów regulatorowych *ysrR-ysrS*”

Pan mgr Tomasz Wołkowicz przedstawił rozprawę doktorską opartą na przeglądzie dostępnej literatury medycznej oraz przeprowadzonych przez badań nad szczepem *Yersinia enterocolitica* DM0110, a w szczególności nad sekwencjami genomu tego szczepu w porównaniu z trzema innymi szczepami tego gatunku w celu wyjaśnienia roli systemu T3SS Ysa jako czynnika zjadliwości tych pałeczek. Temat podjęty przez doktoranta jest bardzo istotny, gdyż zakażenia powodowane przez *Y. enterocolitica* stanowią nadal znaczny problem epidemiczny w Polsce. Pan mgr Tomasz Wołkowicz przeprowadził wszechstronne, nowoczesne badania molekularne. Przedstawiona do recenzji jego praca doktorska liczy ona 160 stron (155 odrębnie numerowanych stron liczy właściwa treść pracy). Praca zawiera 7 tabel i 16 rycin — autor numeruje ryciny i tabele jako kolejne elementy określonych podrozdziałów przy czym zamieścił odrębne spisy rycin i tabel. Bardzo bogata bibliografia liczy łącznie 228 pozycji ułożonych alfabetycznie zgodnie z nazwiskami autorów — autor stosuje cytowanie w systemie harwardzkim.

Praca jest niestety niepotrzebnie zbyt obszerna, przez co rozmywa się istotne znaczenie uzyskanych wyników. Autor zastosował także nieco barokowy styl tytułu; wydaje się, że można by go skrócić z pożytkiem dla jego czytelności.

Pierwsza część pracy to wstęp liczący 42 strony. W tej części stanowiącej rozbudowaną analizę literatury autor opisuje tło swojej pracy. Po pierwsze opisuje podstawowe cechy bakterii *Y. enterocolitica*, a następnie przedstawia epidemiologię zakażeń tymi bakteriami. Jednakże główną część wstępu stanowi przedstawienie czynników odpowiedzialnych za wirulencję *Y. enterocolitica*. Ogólnie rzecz biorąc rozdział ten prezentuje doskonałą orientację autora w aktualnym stanie badań i piśmiennictwie. Bardzo ciekawe są np. przytaczane przez doktoranta dane na temat możliwości zakażenia owadów przez *Y. enterocolitica* i roli tej drogi w ewolucji zakaźności

tych pałeczek dla ssaków. Jedyna uwaga recenzenta dotyczy tego, że autor stosuje zbyt szczegółowy podział tej części na podrozdziały, co jest zbyteczne.

W dwustronicowej części nazwanej „Założenia i cel pracy” autor wyjaśnia, dlaczego podjął ten temat, jak również opisuje w skrócie przebieg badań. Wynika z niego, że podstawowym motywem podjęcia się badań przez doktoranta była chęć wyjaśnienia roli wyspy patogenności/systemu T3SS Ysa w epidemicznym szczepie 1B/08 występującym w zakażeniach człowieka wykrywanych w Polsce, w szczególności dysfunkcji tego systemu w tym szczepie. Pobocznym celem badań doktoranta było opracowanie testu molekularnego wykrywającego mutacje w tym systemie w celu typowania epidemiologicznego pałeczek *Y. enterocolitica* należących do bioserotypu 1B/08. Informacja na temat zrealizowania postawionych sobie celów na początku rozprawy jest niepotrzebna (str. 44).

Rozdział „Materiały i metody” liczy 33 strony. Autor tutaj bardzo szczegółowo przedstawił każdą z zastosowanych metod. Doktorant opisał techniki amplifikacyjne, stosowane startery, metodę elektroporacji i klonowania, a następnie analizę bioinformatyczną w odniesieniu do uzyskanych sekwencji Ysa-PI porównywanych 3 szczepów pałeczek *Y. enterocolitica* i analizę transkryptosomu. Doktorant opisał też metody badania uzyskanych produktów białkowych, a także opracowaną przez siebie, bardzo prostą metodę wykrywania mutacji w genie *ysrR* opartą na oporności zmutowanej sekwencji na jeden enzym restrykcyjny i sprawdził jej efektywność na szczepach tego gatunku z kolekcji PZH i szczepach referencyjnych. Niestety rozdział ten jest nieco za długi, ponieważ zawiera często zbyteczne opisy (np. szczegółowy opis sporządzania poszczególnych buforów).

Po przeprowadzeniu zaplanowanych badań doktorant uzyskał wiele bardzo istotnych danych dotyczących porównania sekwencji wyspy patogenności Ysa-PI (dlaczego w tekście ten skrót jest czasami pisany jako Ysa, a czasami jako YSA?), co zostało udokumentowane liczącym sobie 13 stron wydrukiem sekwencji nukleotydów i aminokwasów (nie wiem czy potrzebnie, bo tego nie analizuje się wzrokiem). Na szczęście autor przedstawił także bardzo jasno sporządzone ryciny pokazujące zmienności i podobieństwa wyspy patogenności Ysa-PI w badanych szczepach. Badanie porównawcze produktu genu *ysrR* występującego w badanych szczepach, w postaci rekombinowanego białka YsrR wykazało, że białko szczepu DM110 było o połowę mniejsze, niż innych szczepów, w wyniku zatrzymania translacji w wyniku mutacji. Na koniec

doktorant przeprowadził wykrywanie mutacji w innych szczepach *Y. enterocolitica* pochodzących z zakażeń oraz w szczepach referencyjnych i stwierdził, że gen niezmutowany był obecny tylko w szczepach kontrolnych, zaś szczepy wyizolowane z przypadków zakażeń, które wystąpiły na terenie kraju wykazywały obecność tej mutacji. Rozdział zaczyna opis analizy sekwencji wyspy patogenności Ysa-Pl. Następnie przedstawia analizę transkryptomu i analizę ekspresji białka YsrR, zaś rozdział kończy analizą stabilności występowania mutacji w genie *ysrR* zarówno w badanym szczepie, jak i w populacji polskich szczepów *Y. enterocolitica*. Rozdział jest bardzo dobrze napisany, w sposób jasny i klarowny przedstawia to, co autor uzyskał w swojej pracy.

Dyskusja została poprowadzona przez doktoranta bardzo sprawnie i szeroko. Liczy 17 stron. Autor w typowy sposób skonfrontował wyniki swoich badań ze stanem wiedzy podanym w aktualnym piśmiennictwie. Szczególnie interesujące są wnioski autora dotyczące pełnej charakterystyki wyspy patogenności Ysa-Pl w wybranym szczepie *Yersinia enterocolitica* DM0110, jej homologii z odmienności polskich szczepów w zakresie obecności i ekspresji wyspy patogenności Ysa-Pl. Recenzent ma nadzieję, że wyniki autora zostaną szybko opublikowane w języku angielskim. Wartość opracowanej przez doktoranta prostej metody wykrywania mutacji charakterystycznej dla polskich szczepów oczywiście wymaga sprawdzenia w innych ośrodkach z zastosowaniem innych szczepów, bo być może nie jest to cecha w pełni dyskryminująca. Podobnie, jak we wstępie, autor poprowadził bardzo ciekawą dyskusję na temat niezbędności systemu Ysa jako czynnika zjadliwości pałeczek *Y. enterocolitica* w świetle globalnych danych epidemiologicznych i jego prawdopodobnej istotnej roli w zakażeniach owadów, zaś mniej ważnej w zakażeniach ssaków. Dyskusja jest wartościowa, chociaż trochę zbyt obszerna, a dobór prac, których wyniki autor porównał z własnymi jest właściwy. Jedyna uwaga dotyczy zbyt szczegółowego podziału tej części na podrozdziały (podobnie, jak we wstępie).

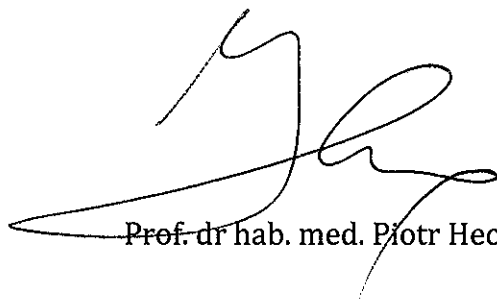
Ostatnia część merytoryczna pracy, czyli „Wnioski” na jednej stronie tekstu w punktach opisuje to, co autor uzyskał w swoich badaniach. Zdaniem recenzenta jest to wręcz modelowa część pracy.

Ogólnie rozprawa robi bardzo dobre wrażenie, bowiem dobór tematu dotyczy bardzo ważnego czynnika etiologicznego ludzkich zakażeń, niekiedy o poważnych konsekwencjach. Autor zastosował do przeprowadzenia swoich badań właściwie dobrane, nowoczesne metody, głównie

opierając się na bardzo dobrej bazie macierzystego zakładu. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i dają dobre podstawy do dalszych badań, których mogłoby być uzyskanie informacji, jakie inne czynniki zjadliwości determinują patogenność szczepów *Yenterocolitica* 1B/O8 i czy rzeczywiście wykrywanie oporności DNA tych szczepów na cięcie jednym enzymem restrykcyjnym ma istotne znaczenie praktyczne. Wyniki są bardzo szczegółowo zilustrowane za pomocą bardzo estetycznych tabel i wykresów. Literatura wybrana do rozprawy pochodzi w większości z ostatnich lat. Styl rozprawy jest też bardzo dobry. Praca jest także dobrze opracowana edytorско — oczywiście są obecne niedociągnięcia, ale są one stosunkowo nieliczne i praca wyróżnia się szczególnie pozytywnie, jeśli uwzględnimy fakt, że autor wykonał wszystko samodzielnie. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo dobra jakość rycin, co niestety nie jest zbyt częste. W pracy przy cytowaniu piśmiennictwa jest używany system Harvard, co utrudnia czasami czytanie tekstu (gdy cytowanych jest kilka publikacji) — w naukach biomedycznych z uwagi na większe liczby odnośników lepiej sprawdza się system Vancouver (cytowanie odnośnikami). Praca autora doskonale spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zaś niedociągnięcia nie mają charakteru merytorycznego, a co najwyżej edycyjny.

Tak więc rozprawę Pana magistra Tomasza Wołkowicza oceniam bardzo dobrze i składam wniosek do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 18 maja 2015.



Prof. dr hab. med. Piotr Heczko