



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. prof. nadzw. Uł Tomasz Popławski

Łódź, dnia 3 grudnia 2014

Katedra Genetyki Molekularnej

Uniwersytetu Łódzkiego

O c e n a

pracy doktorskiej mgr. Anny Krzyżamowskiej

pt.: „*Genetyczne różnicowanie wybranych serowarów Salmonella enterica subsp. enterica*”

W erze premolekularnej sposoby określania pokrewieństw bakterii obejmowały porównywanie danych fenotypowych uzyskanych z badań morfologii, fizjologii i innych cech organizmów poddających się obserwacjom. Metody te zostały obecnie wyparte przez techniki molekularne z których największą popularnością w środowisku naukowym cieszą się metody oparte na analizie profili DNA. Umożliwiają one min. odróżnienie homologii od analogii, dają wspólną miarę do oceny dywergencji czy też ułatwiają mechanistyczną ocenę ewolucji. Kluczowym elementem decydującym o skuteczności tych technik jest dobór odpowiedniego do celu badania markera molekularnego, który musi charakteryzować się zmiennością umożliwiającą odróżnianie osobników między gatunkami i wewnątrz gatunku. Pomimo stałego obniżania cen sekwencjonowania pojedynczego genomu bakteryjnego metody różnicowania bakterii przez analizę markerów molekularnych DNA będą nadal atrakcyjnym narzędziem badawczym z powodu relatywnie niskich kosztów i szybkości analizy, stąd uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej. W opiniowanej pracy podjęto badania, których celem była:

- ocena skuteczności metody TRS-PCR w różnicowaniu serowarów *Salmonella enterica* subsp. *enterica*,
- opracowanie metody różnicującej serowary *Salmonella enterica* subsp. *enterica* w oparciu o obecność motywów VNTR w regionie Sal-175,
- ocena stabilności genetycznej elementów VNTR stosowanych w genotypowaniu serowarów *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium oraz porównanie ze stabilnością regionu Sal-175

Przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań było możliwe dzięki współpracy z Państwowym Zakładem Higieny Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Laboratorium Synevo. Materiał do badań stanowiła kolekcja szczepów licząca 169 izolatów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* obejmująca szczepy *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Anatum* oraz *S. Newport*. Lektura części eksperymentalnej pracy jednoznacznie wskazuje, że wykonano bardzo rozległy, rzetelny zakres badań za pomocą właściwych, logicznie zaplanowanych metod badawczych. Analizowano wzory różnicujące otrzymane za pomocą sześciu różnych technik różnicujących bazujących na reakcji PCR. Badano *in silico* genom *Salmonella enterica* subs. *enterica* na obecność elementów TRS i VNTR. Oryginalnym aspektem przeprowadzonych badań, była ocena stabilności regionów VNTR genomu badanego gatunku *Salmonella*. Na podkreślenie zasługuje także opracowanie i wprowadzenie nowego testu różnicującego *Salmonella enterica* subs. *enterica* w oparciu o elementy TRS i potwierdzenie jego efektywności różnicującej poprzez weryfikację przynależności szczepowej błędnie zidentyfikowanych za pomocą innych metod szczepów badanej kolekcji. Na podstawie przeprowadzonych analiz uzyskano bardzo istotne z poznawczego punktu widzenia wyniki. Do najważniejszych, należy opracowanie testów molekularnych różnicujących serowary *Salmonella enterica* subsp. *enterica* wykorzystujące sekwencje TRS i VNTR oraz wykazanie, że badane loci VNTR różnią się stabilnością. Oceniana praca licząca 102 strony ma układ typowy dla rozpraw doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych z dwoma wyjątkami, które zostały opisane w dalszej części recenzji.

Przedstawioną do recenzji rozprawę rozpoczyna 16 stronicowa część teoretyczna, w kolejnych rozdziałach której przedstawiono aktualny stan wiedzy odnośnie klasyfikacji oraz metod wykorzystywanych do diagnostyki i epidemiologii rodzaju *Salmonella*. Wiele uwagi poświęcono interakcjom patogen-środowisko-gospodarz. Poszczególne zagadnienia zostały opisane w sposób przejrzysty i kompetentny, a co zasługuje na podkreślenie zostały bardzo dobrze zilustrowane 3 rycinami oraz jedną tabelą przygotowanymi na podstawie najnowszej literatury przedmiotu. Szeroka wiedza Doktorantki w zakresie przedstawionej problematyki badawczej znajduje swój wyraz w liczbie cytowanych w dysertacji pozycji literaturowych wynoszącej -121 w znakomitej większości oryginalnych prac anglojęzycznych. Niestety nie mam informacji czy Doktorantka jest autorem/współautorem pracy poglądowej obejmującej treści rozprawy.

Cel pracy został jasno sformułowany – nie ma wątpliwości do czego dąży autorka, a kolejne właściwie zaplanowane etapy badań są w pełni uzasadnione. Rozdział Materiały i Metody w sposób szczegółowy opisuje stosowane techniki badawcze.

Wyniki przeprowadzonych pracochłonnych i czasochłonnych badań zaprezentowane zostały w formie graficznej na 16, często złożonych rycinach i przedstawione w pięciu tabelach. W rzeczowej Dyskusji Doktorantka, w sposób właściwy, konfrontuje uzyskane wyniki z danymi z piśmiennictwa. Pod względem

formalnym praca została przygotowana starannie i poprawnie, nie zauważyłem błędów literowych. Tekst rozprawy poprzedza wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy. Powszechny jest pogląd, że wykaz skrótów nie powinien obejmować skrótów powszechnie stosowanych w biochemii takich jak np. PCR czy dNTPs, ani symboli chemicznych ($MgCl_2$). Oczywiście można dyskutować, czy bardziej uprzejme względem Czytelnika jest zakładanie, że dysponuje on pewną wiedzą podstawową, czy też założenie, że lepiej mu na wszelki wypadek wyjaśnić, co kryje się pod skrótem „PCR”. Rozprawa zaopatrzona jest w streszczenie w języku polskim i angielskim. Nie ma oficjalnego wymogu, by rozprawa miała streszczenie angielskie, jednak w dobie globalizacji i intensyfikacji międzynarodowych kontaktów naukowych umieszczenie go jest cennym elementem.

Ponieważ z założenia recenzent tropi niedociągnięcia, błędy etc. dlatego w dalszej części recenzji chciałbym je przedstawić:

- Układ rozprawy jest niemal typowy dla rozpraw promocyjnych z wyjątkiem braku sekcji „Uzasadnienie podjęcia tematu” oraz „Wnioski”. Pierwsza z nich jest niezbędna po to, aby czytelnik mógł zrozumieć dlaczego Doktorantkę zainteresował taki temat badań i tym samym może sprawiać wrażenie, że Doktorantka podjęła się jego realizacji z innych powodów niż naukowe. Wnioski stanowią zaś integralną część pracy doświadczalnej – dopuszczalne jest umieszczenie wniosków w ostatnim akapicie Dyskusji – aczkolwiek nie należy łączyć rozdziału Wyniki z Dyskusją, gdyż czytelnik może nie rozróżniać wyników badań własnych od wyników uzyskanych innymi badaczami. Nie należy również zastępować wniosków zestawieniem wyników.
- Z zupełnie niejasnych dla mnie powodów „Wprowadzenie” zawiera pakiet wyników *in silico* (sekcja 3.5, rysunki 2 i 3), które powinny znaleźć się w innym miejscu (i znalazły się w sekcji 6.2.1). Podobnie ostatni akapit rozdziału „Wyniki” zawiera świetnie przeprowadzoną dyskusję a z kolei w „Dyskusji” pojawia się opis wyników własnych.
- kolejna moja uwaga dotyczy celowości eksperymentów dotyczących analizy podobieństwa wzorów prążkowych *Salmonella* wykorzystując startery, co do których „nie spodziewano się otrzymania z ich użyciem dobrej jakości wzorów” (str. 52). Czy w takim razie Doktorantka nie zmarnowała czasu i pieniędzy?
- Doktorantka nie stosuje zasad dobrego stylu naukowego min:
 - stosuje ogólnikowe zwroty takie jak (niewątpliwy, oczywisty, ciągły itd.) oraz zamieszcza zbędne informacje, które zwiększają czas potrzebny na przeczytanie i zrozumienie tekstu (podręcznikowym wręcz przykładem jest tu informacja o Mary Mallon).
 - wstawia przymiotniki relacyjne o charakterze względnym oraz przysłówki jakościowe np.: nieduża zmienność (str. 83 - nieduża czyli jaka? - wypadałoby podać czytelnikowi jakąś skalę odniesienia, aby mógł sam ocenić); wysoka moc dyskryminacji (str. 25 - wysoka czyli jaka?); przylegają silnie do nabłonka jelita (str. 15 - tutaj ten przysówek można było pominąć); dobrze przylegają (str. 15. – jak rozumiem są bakterie,

które „źle” przylegają, inną sprawą jest to, że wypadaloby poinformowac czytelnika do czego tak dobrze komórki *Salmonella* przylegają...)

- nie jest konsekwentna w stosowaniu nazw łacińskich gatunków zwierząt – czym zasłużyła sobie kura, że Doktorantka przedstawia jej nazwę łacińską *Gallus gallus*, marginalizując inne gatunki takie jak indyk (*Meleagris gallopavo*), świnia (*Sus scrofa domestica*) czy też bydło domowe (*Bos taurus*) (str. 14).

- brakuje konsekwencji w zastosowaniu jednej liczby osobowej – raz używa czasowników w liczbie pojedynczej, a potem używa liczby mnogiej lub formy bezosobowej – str. 88 – „mojego projektu” a w następnym zdaniu „dla nas”.

Brak stylu naukowego powoduje, że czytelnik ma problemy ze zrozumieniem tekstu – prosiłbym więc Doktorantkę, aby wyjaśniła kilka nieścisłości, które zauważyłem podczas lektury Jej pracy:

- Zdanie „Choroba trwa 2-7 dni i najczęściej nie wymaga hospitalizacji oraz podawania antybiotyków, które mogłyby wydłużyć okres nosicielstwa pałeczek *Salmonella*. (str. 16)” sugeruje, że antybiotyki wydłużają okres nosicielstwa pałeczek – wymaga to szerszego wyjaśnienia.

- co oznacza „głębsza identyfikacja izolatu bakteryjnego” (str. 21)

- co Doktorantka rozumie przez „dostatecznie bliską odległość względem siebie” (str. 22)

- co oznacza „wysoka moc dyskryminacji” (str. 25)

- nie bada się czegoś „pod kątem obecności sekwencji ” ale „analizuje na obecność sekwencji lub motywów” (str. 50)

- jaki jest łącznik pomiędzy *E. coli*, *Mycobacterium* a *Salmonella*? Zdanie na str. 83 „ Naturalną konsekwencją tych badań było założenie, że test ten może również skutecznie różnicować szczepy *Salmonella*” sugeruje taką zależność.

- publikacji się nie przywołuje a cytuje (str. 83)

- nie rozumiem o co chodzi z „generacją wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych” w przedostatnim akapicie na stronie 89.

- podobnie nie wiem o co chodzi w trzecim akapicie na stronie 90, gdzie Doktorantka napisała, że „region jest wysoce polimorficzny” a z dalszej części akapitu dowiadujemy się, że grupa naukowców „nie stwierdziła w nim zmian”. To w końcu ten region genomu jest zmienny (polimorficzny), czy też nie?

Lista uwag, które przedstawiłem w recenzji nie jest w stanie zmienić mojego pozytywnego obrazu całości recenzowanej rozprawy doktorskiej, który powstała w wyniku rzetelnych analiz molekularnych. O oryginalności uzyskanych wyników świadczy fakt ich opublikowania w czasopiśmie *Molecular Biology Reports* o 5-letnim współczynniku oddziaływania blisko 2,5. Włączenie większości wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej do jednego artykułu jest dowodem, że nadrzędnym celem pracy było rozwiązanie problemu badawczego, a nie pogoń za publikacjami. Zasługuje to na podkreślenie, gdyż w

obecnym sparametryzowanym systemie oceny naukowców, trudno nie ulec pokusie publikowania za wszelką cenę.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając zarówno koncepcje badawcze, warsztat praktyczny zastosowany w pracy, jak i godny podziwu ogrom pracy włożony w jej wykonanie, z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr. Anny Krzyżanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. prof. nadzw. Uł Tomasz Poptawski