

Prof. dr hab. inż. Sebastian Deorowicz  
Katedra Algorytmiki i Oprogramowania  
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki  
Politechnika Śląska  
44-100 Gliwice, ul. Akademicka 16

Gliwice, 23.10.2024 r.

## Recenzja rozprawy doktorskiej

### **Tytuł rozprawy:**

Identyfikacja i charakterystyka rho-niezależnych terminatorów transkrypcji u bakterii oraz ich udział w odpowiedzi na stres antybiotykowy

### **Autor:**

mgr Jan Grzegorz Kosiński

### **Promotor:**

dr hab. Marek Życiński, prof. UAM

### Problematyka rozprawy

Recenzowana rozprawa dotyczy problematyki uzyskiwania lekooporności przez różne gatunki bakterii. Problem ten jest poważny, gdyż nadmierne stosowanie leków może doprowadzić w niedalekiej przyszłości do ograniczenia skuteczności terapii antybiotykowej. Cały czas trwa zatem swoisty wyścig pomiędzy naukowcami opracowującymi nowe leki a bakteriami doskonalącymi swoje mechanizmy obronne. Porażka ludzi oznaczałaby cofnięcie nas do ery przed wynalezieniem antybiotyków i drastyczny wzrost liczby zgonów wywoływanych przez bakterie. Kluczowym elementem koniecznym do poprawy skuteczności antybiotyków jest zrozumienie mechanizmów, które występują w komórkach bakterii a w szczególności strategii stosowanych przez bakterie w walce z lekami.

Znaczne przyspieszenie prac nad nowymi terapiami antybiotykowymi możliwe stało się dzięki spopularyzowaniu wysokoprzepustowych technologii sekwencjonowania. Ogromne znaczenie miało też bardzo duże obniżenie kosztów sekwencjonowania na przestrzeni ostatnich 20 lat. Wyniki wielu eksperymentów sekwencjonowania umieszczane są w publicznych repozytoriach takich jak np. SRA, dzięki czemu możliwe jest wykorzystanie wyników innych eksperymentatorów w pracach nad opracowaniem nowych metod bioinformatycznych, w szczególności algorytmów oraz ich implementacji, które uruchamiane są na komputerach, z dala od laboratoriów. Otwiera to także szerokie pole do interdyscyplinarnej współpracy pomiędzy społecznością biologów, informatyków, matematyków, statystyków. O tym jak dużą rolę metody informatyczne zaczynają odgrywać w świecie nauk o życiu świadczyć może m.in. przyznanie Nagrody Nobla w br. dla naukowców, którzy opracowali komputerowe metody predykcji struktury przestrzennej białek.

Omawiana rozprawa jest bez wątpienia interdyscyplinarna i koncentruje się na wykorzystaniu metod obliczeniowych, a także opracowaniu nowych takich metod, do poprawy naszego zrozumienia problematyki reakcji bakterii na stres antybiotykowy.

## Analiza treści rozprawy oraz uzyskanych wyników

### Treść rozprawy

Doktorant postawił sobie za cel stworzenie nowych metod mogących znaleźć zastosowanie w wykrywaniu (oraz adnotacji) rho-niezależnych terminatorów transkrypcji u bakterii. Wykorzystał w tym celu m.in. dane dostępne w bazach danych takich jak SRA.

Rozprawa ma postać hybrydową. Obszerne fragmenty napisane są w języku polskim, ale wplecione są także kompletne teksty 3 artykułów, których współautorem jest Doktorant. Artykuły te zostały napisane w języku angielskim. Całość składa się z 14 rozdziałów.

Pierwszych 6 rozdziałów to tak naprawdę: polsko- oraz anglojęzyczne streszczenie, informacja o źródłach finansowania, lista publikacji wchodzących w skład rozprawy, dorobek publikacyjny autora oraz wykaz stosowanych skrótów. Ostatnie 3 rozdziały to spis literatury, załączniki a także oświadczenia współautorów dotyczące merytorycznego wkładu w kluczowe publikacje. Tak więc właściwa treść rozprawy obejmuje rozdziały od 7. do 11.

Rozdział siódmy stanowi obszerne, bo blisko 50-stronicowe, wprowadzenie w poruszaną tematykę. Autor rozpoczyna "klasycznie" od wspomnienia czym są kwasy nukleinowe, jak wygląda centralny dogmat biologii molekularnej. Następnie dowiadujemy się trochę więcej o syntezie cząsteczek RNA u bakterii, co jest istotne, z uwagi na tematykę rozprawy. Kolejny, krótki, podrozdział informuje o roli cząsteczek RNA w komórkach bakteryjnych. Czwarty podrozdział to wklejony tekst przeglądowego artykułu omawiającego wpływ struktur drugorzędowych RNA na regulację ekspresji genów. Artykuł ten powstał we współpracy 6 osób, z których aż 4 pierwsze zostały oznaczone jako pierwsi współautorzy. Kolejny podrozdział dotyczy związku pomiędzy terminacją transkrypcji a problemem lekooporności bakterii. W dalszej części Doktorant skupia się na mechanizmach lekooporności u gronkowca złocistego. Ten gatunek bakterii przyczynia się do dużej liczby zgonów, więc stanowi duże wyzwanie zarówno dla świata naukowców, jak i lekarzy. Następnym omawianym aspektem są metody identyfikacji miejsc terminacji transkrypcji.

Jednostronicowy rozdział ósmy zwięźle definiuje zarówno cele ogólne, które postawił sobie doktorant, jak i cele szczegółowe. Najważniejsze z nich to opracowanie kilku programów komputerowych, które pozwoliłyby na identyfikację oraz adnotację terminatorów na podstawie danych z eksperymentów sekwencjonowania a także identyfikacja rho-niezależnych terminatorów transkrypcji u bakterii, w szczególności u gronkowca złocistego.

Rozdział dziewiąty zatytułowany "Metody" krótko charakteryzuje wykorzystane zestawy danych. Następnie omawia wykorzystane narzędzia i wspomina opracowane przez Doktoranta narzędzia czy bazy danych.

Rozdział dziesiąty o tytule "Wyniki i dyskusja" przedstawia zarówno opis stworzonych programów, jak i uzyskane wyniki. Taki układ wynika zapewne z faktu, że integralną część tego rozdziału stanowią pełne teksty dwóch artykułów Doktoranta. I tak, w pierwszym podrozdziale przedstawione jest narzędzie TERMITE. Służy ono do identyfikacji i adnotacji stabilnych 3' końców RNA. Pełny tekst artykułu poprzedzony jest jednostronicowym umówieniem jego zawartości. Artykuł ten aktualnie (na dzień pisania recenzji) ma formę preprintu dostępnego w serwisie bioRxiv.org. Drugi podrozdział omawia narzędzie termiRNATOR. Jest to metoda przewidywania miejsc terminacji transkrypcji na podstawie danych RNA-seq. Doktorant wykorzystał tutaj metody uczenia maszynowego, w szczególności lasy losowe. Trzeci podrozdział to omówienie kolejnego narzędzia, AGOUTI, służącego do adnotacji interwałów genomowych oraz transkryptomowych. Podrozdział ten jest w postaci tekstu artykułu Doktoranta. Czwarty i piąty podrozdział to przedstawienie opracowanego w ramach rozprawy atlasu

rho-niezależnych terminatorów transkrypcji u wybranych szczepów gronkowca złocistego a także charakterystyka tychże terminatorów. Ostatni podrozdział zawiera analizę warunkowej terminacji transkrypcji w odpowiedzi na stres antybiotykowy u wybranego gatunku bakterii.

Rozdział jedenasty stanowi zwięzłe podsumowanie uzyskanych w pracy wyników.

Bibliografia rozprawy zawiera 94 dość dobrze dobrane pozycje.

#### Najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie

Doktorant opracował 3 programy komputerowe oraz atlas rho-niezależnych terminatorów transkrypcji. Nie jest wykluczone, że będąc informatykiem moja ocena wagi uzyskanych wyników będzie wynikała bardziej z aspektów informatycznych niż ze znaczenia biologicznego. Niemniej za najciekawsze wyniki uważam dwa, jeszcze nieopublikowane, narzędzia TERMITE oraz termiRNATOR. Pierwsze z nich doczekało się już preprintu a liczę, że drugie nie będzie gorsze.

Tworzenie narzędzi bioinformatycznych zawsze nacechowane jest sporym ryzykiem. Jeśli robią to biolodzy, to informatyk łatwo może pokusić się o krytykę aspektów technicznych i stwierdzenie, że informatycznie nie ma w tym nic ciekawego. Z drugiej strony, jeśli za opracowanie takowych narzędzi bierze się informatyk, to środowisko biologów może łatwo ocenić, że może i technicznie oprogramowanie jest zaawansowane, ale w praktyce jest kompletnie bezużyteczne. Stąd też jako osoba mierząca się z tym wyzwaniem już od wielu lat, mam spore uznanie dla osób z ewidentnie dużą wiedzą biologiczną (jak w przypadku Doktoranta), która potrafi twórczo wykorzystać to co daje świat informatyki do rozwiązywania problemów biologicznych. Mam tu na myśli w szczególności pokuszenie się o wejście w świat uczenia maszynowego i relatywnie udaną próbę wykorzystania tych technik do stworzenia narzędzia, które, jak wierzę, może być przydatne dla szerszej społeczności biologów zajmujących się tematyką lekooporności bakterii.

Na kolejnym miejscu umieściłbym opracowany atlas. Wygląda to na solidną pracę. Niemniej w przypadku wszelkich baz danych zawsze zachodzi duże ryzyko szybkiej dezaktualizacji zawartych w nich informacji. Żeby się tak nie stało to konieczna jest ciągła praca nad uzupełnianiem jej zawartości. Mam nadzieję, że Doktorat (bądź jego Promotor, być może z pomocą innych osób) będą mieli w sobie wystarczająco wytrwałości by o to zadbać.

Ostatnie opracowane narzędzie, AGouTI, umieszczam na końcu mojej subiektywnej listy. Nie oznacza to, że uważam je za mało ważne. W mojej ocenie jest to dość solidnie wykonane narzędzie, które może być w praktyce przydatne. Niemniej jest ono raczej aplikacyjne i patrząc od strony czysto informatycznej wydaje mi się najmniej interesujące.

#### Uwagi merytoryczne

Powyższa część mojej recenzji była dość pozytywna, bo też taka jest moja opinia o rozprawie. Uważam, że Doktorant udanie zmierzył się z problemem określonym w temacie. Kierunek prac jest w miarę spójny a opracowane narzędzia mogą być przydatne. Doceniam upublicznienie kodów narzędzi w serwisie GitHub, co daje szansę na wykorzystanie ich przez społeczność osób zajmujących się pokrewną tematyką.

Mam jednak pewne uwagi krytyczne i prosiłbym o odniesienie się do nich w trakcie publicznej obrony.

1. Dość dziwnie wygląda podrozdział 7.4. Jest to tekst artykułu przeglądowego. Nie ma w tym nic złego, ale fakt, że aż 4 pierwszych autorów deklaruje równy udział w jego opracowaniu może

rodzić wątpliwości czy ten sam tekst znajdzie się/znalazł się w 3 innych rozprawach? Nieco dziwnie wyglądają też oświadczenia współautorów. Aż trzy z nich stwierdzają, że autorzy odegrali kluczową rolę ("pivotal role") w opracowaniu wizualizacji. W mojej opinii kluczową rolę może odegrać jedna osoba, no może dwie, ale 3 to przesada.

2. Omawiając cele pracy Autor stwierdza "Szczególny nacisk zostanie położony na adnotację oraz porównanie charakterystyki wspomnianych terminatorów u 14 gatunków bakterii, tak by możliwe było dokładne określenie ich zróżnicowania w obrębie królestwa bakterii". Czy to nie nazbyt optymistyczne stwierdzenie, że analiza 14 gatunków pozwala na "**dokładne określenie...**"?
3. Przy omawianiu protokołu dla narzędzia termiRNAator (str. 69-70) mowa jest o tym, że wyniki działania na końcu są jeszcze analizowane przez program TransTermHP. Można zatem zapytać co narzędzie termiRNAator daje i czy można by się bez niego było obejść.
4. W rozprawie brakuje mi informacji o czasach działania, zapotrzebowaniu na pamięć, konfiguracji sprzętowej, na której wykonywane były testy. W przypadku danych z sekwencjonowania wysokoprzepustowego zwykle mamy do czynienia z dużymi rozmiarami danych. W takiej sytuacji koszty obliczeniowe mogą być spore. Ciekawie wyglądałoby też porównanie pod tym kątem narzędzi Doktoranta z narzędziami konkurencyjnymi.

#### Uwagi redakcyjne

Ogólna kompozycja rozprawy jest poprawna. Sposób składu tekstu także jest poprawny. Strona formalna także nie budzi moich większych zastrzeżeń. W pracy pojawiają się jednak drobne błędy redakcyjne. Ich liczba nie jest duża i, z jednym wyjątkiem, nie utrudnia lektury, więc ograniczę się tylko do wskazania niektórych:

- [str. 6] "praca dyplomowa"
- [str. 19] "Crick'a" -> "Cricka"
- [str. 21] Rysunek powinien być na wcześniejszej stronie
- [str. 45] "Świecie" -> "świecie"
- [rozd. 9] Występują tu liczne błędne odwołania do rozdziałów z tekstami artykułów, np. opisane "Rozdział 9.1" (zamiast Rozdział 10.x) a także do nieistniejących rozdziałów 8.3, 8.4.
- [str. 69] "wg."
- [str. 73] "Hochberg'a" -> "Hochberga"
- [str. 85] "W chwili pisania niniejszego rozdziału" - czytelnik nie wie kiedy był pisany ten rozdział, więc powinna być podana data
- [str. 89] W tabeli jest PP a w def. precyzji widzimy TP

#### Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera interesujące wyniki. Tematyka jest bez wątpienia ciekawa i ważna. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do dalszych prac. Drobne niedociągnięcia redakcyjne nie umniejszają mojej pozytywnej oceny przedłożonej rozprawy.

#### Konkluzja

Podsumowując opinie zawarte w mojej recenzji, mogę stwierdzić, że recenzowana rozprawa mgra Jana Grzegorza Kosińskiego nt. „Identyfikacja i charakterystyka rho-niezależnych terminatorów transkrypcji

u bakterii oraz ich udział w odpowiedzi na stres antybiotykowy” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa spełnia zatem warunki określone w ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2023 poz. 742 ze zm.) art. 187 ust. 1-2. Zawarte w recenzji uwagi krytyczne mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Wnoszę zatem o dopuszczenie wspomnianej rozprawy do publicznej obrony.

Sebastian Dębski