

AUTOREFERAT

dr Krystyna Dąbrowska

Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk

Wrocław, 20 sierpnia 2014

1. Krystyna Dąbrowska**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe / artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- 06.12.2004 Doktor nauk biologicznych, nadany przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk dnia, tytuł rozprawy: „Badanie interakcji bakteriofagów z komórkami ssaków oraz ich potencjalne znaczenie”, promotor w przewodzie doktorskim prof. dr hab. n. med. Andrzej Górski
- 08.09.2000 Magister mikrobiologii ze specjalnością genetyka, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, tytuł pracy: „Analiza funkcjonalna i strukturalna genu YPR117w z prawego ramienia XVI chromosomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”, promotor pracy prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski
- 28.06.1998 Licencjat na kierunku ochrona środowiska, uzyskany na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, promotor pracy prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski

Wykształcenie uzupełniające, najważniejsze pozycje:

- 11.06.2011 Dyplom studiów podyplomowych „Zarządzanie projektami - instrumentarium współczesnego menadżera”, uzyskany na Wydziale Zarządzania, Informatyki i Finansów Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu.
- 25.05.2012 Dyplom ‘Enterprisers’ w dziedzinie przedsiębiorczości, Centre for Entrepreneurial Learning, Uniwersytet Cambridge
- 05.07.2012 Dyplom ‘Ignite’ w dziedzinie przedsiębiorczości, Centre for Entrepreneurial Learning, Uniwersytet Cambridge

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 15.11.2000 – 15.11.2004 Studentka Studium Doktoranckiego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
- 16.11.2004 – 01.01.2005 Pracownik Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN na stanowisku specjalisty
- 01.01.2005 – 01.07.2005 Pracownik Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN na stanowisku asystenta
- 01.07.2005 - obecnie Pracownik naukowy Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN na stanowisku adiunkta

4. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 4, objęty tytułem:

„Badania strukturalnych białek bakteriofagowych dla rozwoju terapii bakteriofagowej: identyfikacja cech biologicznych oraz opracowanie nowych rozwiązań technologicznych w modelu bakteriofaga T4”

1. Oslizło A., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Owczarek B., Kopciuch A., Figura G., **Dąbrowska K.**: Purification of phage display-modified bacteriophage T4 by affinity chromatography. *BMC Biotechnology* 11:59, 2011, **IF 2,349 / MNiSW: 30**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, analiza wyników, samodzielne napisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku, przygotowanie konstrukcji plazmidowych, ustalenie metodyki ekspresji, wiodący udział w ustaleniu metodyki phage display, rozdziału chromatograficznego i proteolizy. Wykonanie znaczącej części doświadczeń phage display, chromatografii oraz oznaczeń koncentracji faga w preparatach.

2. Miernikiewicz P., Owczarek B., Piotrowicz A., Boczkowska B., Rzewucka K., Figura G., Letarov A., Kulikov E., Kopciuch A., Światała-Jeleń K., Oslizło A., Hodyra K., Gubernator J., **Dąbrowska K.** Recombinant expression and purification of T4 phage Hoc, Soc, gp23, gp24 proteins in native conformations with stability studies. *PLoS ONE* 7(7):e38902, 2012, **IF 3,73 / MNiSW: 40**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 60 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, oraz w napisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku. Przygotowanie trzech konstrukcji plazmidowych, ustalenie metodyki ekspresji, wykonanie części preparatów oczyszczonych białek (ok. 30%), wykonanie wszystkich oznaczeń struktury drugorzędowej białek oraz ich stabilności metodą dichroizmu kołowego, udział w określeniu agregacji białek metodą dynamicznego rozproszenia światła (ok. 60% oznaczeń).

3. Miernikiewicz P., **Dąbrowska K.**, Piotrowicz A., Owczarek B., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Hodyra K., Macegoniuk K., Rzewucka K., Kopciuch A, Majka T, Letarov A, Kulikov E., Maciejewski H., Górski A.: T4 phage and

its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS ONE* 8(8):e71036, 2013, **IF 3,534 / MNiSW: 40**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 30 %: pomysłodawca przeprowadzonych badań, istotny udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, oraz w napisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku. Udział w przygotowaniu preparatów białkowych do badań oraz w wykonaniu doświadczeń w modelu mysim.

4. Ceglarek I., Piotrowicz A., Lecion D., Miernikiewicz P., Owczarek B., Hodyra K., Harhala M., Górski A., **Dąbrowska K.**: A novel approach for separating bacteriophages from contaminating bacteriophages of other types using affinity chromatography combined with competitive phage display. *Scientific Reports* 3, 3220, 2013, **IF 5,087 / MNiSW: 40**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań. Samodzielne planowanie doświadczeń i analiza wyników oraz napisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku. Przygotowanie wszystkich konstrukcji plazmidowych z C-końcówką lokalizacją metki wiążącej, nadzór i przeprowadzenie wyjściowych doświadczeń dla ustalenia metodyki ekspresji, phage display i rozdziatów chromatograficznych. Udział w określeniu stężenia LPS w badanych preparatach.

5. Kaźmierczak Z., Piotrowicz A., Owczarek B., Hodyra K., Miernikiewicz P., Lecion D., Harhala M., Górski A., **Dąbrowska K.**: Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. *Bacteriophage* 4(1):e28364, 2014, **IF 0 / MNiSW: 0**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 75 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, oraz w napisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku. Przygotowanie konstrukcji plazmidowej wykorzystywanej do ekspresji fuzji białka znakowanego GFP, ustalenie metodyki ekspresji oraz detekcji fluorescencji. Wiodący udział w wykonaniu doświadczeń w modelu zwierzęcym.

6. Gamkrelidze M., **Dąbrowska K.**: T4 bacteriophage as a phage display platform. *Archives of Microbiology* 196(7):473-9, 2014, **IF 1,861/ MNiSW: 20**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 60 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca pracy, wiodący udział w napisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku.

7. **Dąbrowska K.**, Kaźmierczak Z., Majewska J., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Wietrzyk J., Lecion D., Hodyra K., Nasulewicz-Goldeman A., Owczarek B., Górski A.: Bacteriophages displaying anticancer peptides in combined antibacterial and anticancer treatment. *Future Microbiology* 9(7), 861–869, 2014, **IF 3,819/MNiSW: 30**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu

doświadczeń, analiza wyników oraz samodzielne napisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku. Przygotowanie wszystkich wykorzystanych w pracy konstrukcji plazmidowych oraz ustalenie metodyki ekspresji białek rekombinowanych, wykonanie części preparatów oczyszczonych bakteriofagów modyfikowanych (ok. 1/3), wiodąca rola w realizacji doświadczeń w modelu mysim, wykonanie większości analizy mikrobiologicznej.

8. **Dąbrowska K**, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, Kaźmierczak Z, Letarov A, Górski A: Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *Journal of Virology* 2014, w druku, doi:10.1128/JVI.02043-14 **IF 4,855 / MNiSW: 40**

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70 %: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, interpretacja uzyskanych wyników, oraz napisanie manuskryptu, wiodąca rola w przygotowaniu pracy do druku. Wiodąca rola w wykonaniu badań w modelu mysim (planowanie, wykonanie i/lub nadzór). Ustalenie schematów immunizacji i metodyki oznaczeń ELISA.

[Dla wymienionych publikacji podano współczynnik wpływu *Impact Factor* ogłoszony dla roku, w którym opublikowano pracę; w przypadku prac z roku 2014 podano współczynnik z roku poprzedzającego t.j. 2013]

b) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl ośmiu prac: siedmiu prac oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej (Załącznik 4). Przedstawiony cykl publikacji przygotowany został w ramach mojej pracy realizowanej w Samodzielnym Laboratorium Bakteriofagowym w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Praktyczne znaczenie tych prac wiąże się bezpośrednio z problemem lekoopornych zakażeń bakteryjnych i rozwojem alternatywnej metody terapii z użyciem wirusów bakteryjnych (bakteriofagów, fagów). Raport EMA/ECDC z 2009 roku informuje, że w samej Unii Europejskiej co roku z powodu lekoopornych zakażeń bakteryjnych umiera około 25 000 pacjentów. Zachorowania na ten rodzaj zakażeń pociągają za sobą koszty opieki zdrowotnej, które łącznie ze stratami z tytułu niezdolności do pracy zostały oszacowane na co najmniej

1.5 miliarda Euro rocznie. Niemożliwe do skwantyfikowania są koszty społeczne, takie jak zależność, wykluczenie i poważne obniżenie jakości życia osób dotkniętych problemem zakażeń lekoopornych. Niestety tempo powstawania i rozprzestrzeniania się bakteryjnych szczepów antybiotykoopornych wyraźnie przewyższa tempo, w jakim opracowywane są nowe antybiotyki i alternatywne leki lub sposoby terapii, jak dotąd zdecydowanie niewystarczające (WHO Guidelines 2012, Matsuzaki et al. Nature 2014, 509(7498):S9). Pilnie potrzebne są nowe rozwiązania i alternatywne środki zdolne do zwalczania bakterii. Obok tak potrzebnych prac nad nowego typu antybiotykami, badania nad bakteriofagami dają realną szansę na uzupełnienie niewystarczającego obecnie arsenału środków dostępnych w walce z lekoopornymi szczepami bakteryjnymi. Przedstawiony cykl prac wpisuje się w ten kierunek badawczy.

Bakteriofagi są tak odległe od antybiotyków, że nie występuje między nimi oporność krzyżowa i fagi mogą być aktywne przeciwko szczepom antybiotykoopornym. Dają więc szansę na stworzenie nowej kategorii preparatów zwalczających bakterie. Największe nadzieje są związane z opracowaniem nowych preparatów leczniczych, w tym weterynaryjnych, ale także preparatów dezynfekcyjnych oraz przemysłowych (np. w produkcji żywności). W swoich badaniach zajęłam się bardzo słabo zbadanym zagadnieniem: oddziaływaniami bakteriofagów z organizmami ssaków. Oddziaływania te, choć niedoceniane, determinują bezpieczeństwo i skuteczność terapii z użyciem bakteriofagów.

Obecnie w leczeniu w krajach zachodnich bakteriofagi są stosowane jedynie jako terapia eksperymentalna (jedyne ośrodki w UE posiadające zgodę na taką terapię znajduje się przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu). Rozwój i ewentualna rejestracja terapii fagowej lub jej odmian są uzależnione m.in. od tego, czy uzupełnimy ubogą jeszcze wiedzę na temat interakcji bakteriofagów z organizmem poddanym terapii. Szczególne znaczenie mają reakcje ze strony układu odpornościowego oraz interakcje pojawiające się w wypadku innych chorób towarzyszących infekcji. W przedstawionym cyklu prac przedmiotem pierwszym z dwóch obszarów badań była reakcja organizmu na bakteriofagi na poziomie mediatorów stanu zapalnego (głównie cytokin), przeciwciał, oraz weryfikacja skuteczności i bezpieczeństwa terapii przy współistniejącym nowotworze. Nowością w przedstawionych pracach w aspekcie interakcji fagów z organizmem ssaka jest powiązanie poszczególnych strukturalnych białek fagowych z efektem, jaki bakteriofagi wywierają na organizm ssaka, t.j. uzupełnienie dotychczasowego

stanu wiedzy o aspekt molekularny. Nowością jest też identyfikacja głównych białek mediujących antygenowy efekt główki fagowej, wykrycie roli tego efektu w neutralizacji faga oraz wykorzystanie białek fagowych jako nośników peptydów aktywnych w jednoczesnej terapii anty-nowotworowej i przeciwbakteryjnej. Ten ostatni aspekt dotyczy bezpieczeństwa terapii i został rozwinięty w pierwszej jak dotąd ocenie wpływu fagów i białek fagowych na produkcję mediatorów stanu zapalnego, co również stanowi nowość w podjętej problematyce.

Każde zastosowanie bakteriofagów, zarówno terapeutyczne, przemysłowe, jak i badawcze, wymaga przygotowania preparatów spełniających wysokie wymagania co do ich czystości i stabilności. Jednym z trudnych problemów jest oczyszczanie fagów z pozostałości bakterii, na których zostały wyhodowane. Dotyczy to zanieczyszczeń takich jak LPS, ale również profagi i inne niepożądane domieszki. W prezentowanym cyklu prac zaproponowane zostały nowe rozwiązania technologiczne, pozwalające na efektywny rozdział makrocząstek, a nawet na oddzielenie wybranego bakteriofaga od podobnych bakteriofagów należących do innego szczepu. Nowością jest zarówno samo podejście, jak i opracowana metodyka pozwalająca na modyfikację kapsydów fagowych bez ingerencji w materiał genetyczny faga, t.j. bez wytworzenia organizmów genetycznie modyfikowanych (GMO). Jako uzupełnienie dostępnych metod badawczych została opracowana również nowa technika obrazowania molekularnego bakteriofagów w tkankach i komórkach, oparta na prezentacji i detekcji białek fluorescencyjnych. Pozwoliła ona na zwizualizowanie retencji bakteriofagów w śledzionie i węzłach chłonnych, a także pochłanianie bakteriofagów przez makrofagi na drodze fagocytozy.

W prezentowanym cyklu prac wykorzystałam następujące techniki/metodykę:

- Klonowanie genów do wektorów plazmidowych w systemach rekombinacyjnych i restrykcyjnych
- Ekspresja, izolacja i analiza białek rekombinowanych (bakteryjne systemy ekspresyjne, metody elektroforetyczne, chromatograficzne oraz fizykochemiczne)
- Rozdziały chromatograficzne: sitowe (FPLC), jonowe (FPLC), powinowactwa (metki GST, His-tag oraz powinowactwo LPS), pozwalające uzyskiwać bakteriofagi i białka bakteriofagowe oczyszczone do poziomu umożliwiającego prowadzenie badań immunologicznych (immunological purity grade)

- Mysie modele *in vivo*: nowotworowe, infekcji, reakcji zapalnej, w tym metody operacyjne, przeszczepianie nowotworów, hodowle komórkowe *ex vivo*
- Metody prezentacji obcych białek i peptydów na powierzchni bakteriofaga 'phage display', w tym opracowanie nowych podejść metodologicznych
- analiza poziomu cytokin w krwi mysiej i ludzkiej (cytokine array oraz ELISA)
- analiza poziomu przeciwciał w krwi mysiej i ludzkiej (ELISA)
- obrazowanie molekularne oparte na fluorescencji (GFP)
- Dichroizm kołowy (CD, circular dichroism)
- hodowle komórkowe i cytometria przepływową (FACS)
- techniki mikroskopowe: mikroskop optyczny, konfokalny, fluorescencyjny
- mikrobiologiczne metody izolacji, hodowli i identyfikacji bakterii i bakteriofagów
- pomiar średnicy hydrodynamicznej cząstek metodą DLS (dynamic light scattering), wykorzystywane do identyfikacji interakcji makrocząstek na poziomie molekularnym
- narzędzie bioinformatyczne (analizy sekwencji genomowych i białkowych, baz danych, projektowanie interakcji makrocząstek)

Za najważniejsze osiągnięte rezultaty uważam:

- **identyfikację struktury drugorzędowej i określenie stabilności wszystkich białek główki bakteriofaga T4 mediujących oddziaływanie kapsydu tych fagów ze środowiskiem zewnętrznym, oraz ustalenie w toku prac metodyki wydajnej, wielkoskalowej produkcji i oczyszczania tych białek w formie natywnej**
- **wykazanie, że białka główki bakteriofaga T4 nie wpływają na produkcję cytokin, w tym na produkcję mediatorów stanu zapalnego, co przemawia za bezpieczeństwem stosowania fagów i wskazuje na istotną różnicę pomiędzy bakteriofagami a wirusami ludzkimi i zwierzęcymi**
- **wykazanie, że nie tylko białka ogonkowe, ale również białka główki fagowej są zdolne do indukcji przeciwciał neutralizujących bakteriofagi, wraz z analizą porównawczą indywidualnej immunogenności poszczególnych białek.**
- **wykazanie możliwości jednoczesnego stosowania bakteriofagów modyfikowanych phage display do terapii przeciwnowotworowej (aktywność nabyta w wyniku inżynierii molekularnej) oraz do terapii przeciwbakteryjnej (aktywność naturalna)**

- **opracowanie metodyki i wykazanie możliwości zastosowania phage display do znakowania bakteriofagów metodą fluorescencyjną oraz ich detekcji w komórkach i tkankach ssaków**
- **opracowanie metodyki oczyszczania bakteriofagów z resztek bakteryjnych a także z domieszek innych fagów (i/lub profagów) poprzez połączenie chromatografii powinowactwa i phage display, a następnie optymalizacja metody w sposób pozwalający uniknąć modyfikacji genetycznych w genomie fagowym, a także ustalenie optymalnego schematu molekularnego modyfikacji**

W kolejnej części autoreferatu przedstawiono podsumowanie wyników opisanych w wybranych do oceny publikacjach.

1. Oslizlo A., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Owczarek B., Kopciuch A., Figura G., **Dabrowska K.**: Purification of phage display-modified bacteriophage T4 by affinity chromatography. *BMC Biotechnology* 2011, 11:59

Praca wprowadza **nowe rozwiązanie technologiczne umożliwiające oczyszczanie bakteriofagów** do poziomu czystości odpowiedniej do badań immunologicznych, dzięki połączeniu techniki 'phage display' i chromatografii powinowactwa.

Metody chromatograficzne stopniowo wypierają tradycyjne sposoby oczyszczania fagów, jak wirowanie w gradiencie chlorku cezu lub sacharozy. Okazują się prostsze, bezpieczne i umożliwiają ciągłe oczyszczanie dużych ilości preparatów, co ma kluczowe znaczenie dla badań *in vivo* (wymagających często zapewnienia odpowiednich dawek terapeutycznych), jak i dla ewentualnych zastosowań terapeutycznych (produkcja) w przyszłości. Do tej pory jednak jedyne rodzaje stosowanej chromatografii to chromatografia sitowa oraz jonowymienna, w tym ich odmiana tzw. kolumny monolityczne. Mimo dość dobrych rezultatów, nie istnieje uniwersalna metoda rozdziałów cząstek fagowych od zanieczyszczeń pochodzących z bakterii i pożywek hodowlanych. Jest tak przede wszystkim dlatego, że bakteriofagi to ogromnie zróżnicowana wewnętrznie grupa, do której nie da się zastosować jednego, wąskiego podejścia technicznego.

W prezentowanej pracy **po raz pierwszy do oczyszczania bakteriofagów została zastosowana chromatografia powinowactwa**. Rozdział był prowadzony po zastosowaniu techniki 'phage display' do prezentacji na powierzchni kapsydu wybranych metek

wiążących typowe złoża powinowactwa (GST, His-tag). Uzyskano bardzo dobrą jakość końcowych preparatów, co pozwala zaproponować połączenie 'phage display' i chromatografii powinowactwa jako nowe rozwiązanie technologiczne dostępne dla badań nad fagami oraz do ich zastosowań w terapii i/lub przemyśle.

Praca zaowocowała też uzyskaniem patentu finansowanego w ramach grantu Patent Plus MNiSW: patent PL212286 i zgłoszenie PCT WO2011/162627A1.

2. Miernikiewicz P., Owczarek B., Piotrowicz A., Boczkowska B., Rzewucka K., Figura G., Letarov A., Kulikov E., Kopciuch A., Świtła-Jeleń K., Oślizło A., Hodyra K., Gubernator J., **Dąbrowska K.**: Recombinant expression and purification of T4 phage Hoc, Soc, gp23, gp24 proteins in native conformations with stability studies. *PLoS ONE* 7(7):e38902, 2012

Praca przedstawia analizę właściwości fizykochemicznych oraz metodykę produkcji wysokooczyszczonych białek bakteriofagowych najsilniej eksponowanych na kapsydie. Dobra ekspozycja białek oznacza, że mają one znaczenie w oddziaływaniach bakteriofagów z czynnikami zewnętrznymi, w tym z organizmami ludzi i zwierząt. Poddane analizie białka to gp23, gp24, gpHoc oraz gpSoc budujące kapsydy bakteriofagów z rodziny T4.

Badanie funkcji biologicznych, w tym interakcji z układem odpornościowym, wymaga otrzymania **najwyższej jakości produktów białkowych w stanie natywnym**, wysokooczyszczonych, utrzymywanych w środowisku zapewniającym dobrą stabilność oraz umożliwiającym badania w warunkach fizjologicznych (np. kultur komórkowych lub *in vivo*). W przedstawionej pracy ustalona została metodyka produkcji białek rekombinowanych z zastosowaniem **równoległej ekspresji białek opiekuńczych (ang. chaperone)**, izolowanych dzięki metkom powinowactwa usuwanym następnie proteolitycznie. Seria rozdzielów chromatograficznych różnego typu pozwoliła na oczyszczenie produktów z pozostałości bakteryjnych, w tym na usunięcie lipopolisacharydów (LPS) do poziomu poniżej 1 jednostki aktywności na mililitr preparatu, co ma szczególne znaczenie dla badań immunologicznych (LPS jest silnym aktywatorem wielu procesów immunologicznych).

Aktywność zanieczyszczeń bakteryjnych, głównie LPS, w preparatach białek uzyskiwanych w bakteryjnych systemach ekspresyjnych jest niestety często bagatelizowana. Dość często przyjmowane jest błędne założenie, że niewystępowanie w

standardowej detekcji HPLC wyraźnego sygnału pochodzącego od zanieczyszczeń oznacza, że preparat charakteryzuje wystarczająca czystość. Tymczasem nawet śladowa ilość silnych aktywatorów procesów immunologicznych (jak LPS) wystarczy, aby w badaniach biologicznych wystąpiła aktywacja badanych procesów, pochytywana błędnie za aktywność testowanego białka. Dlatego też prezentowana praca wnosi oryginalny wkład we wszystkie badania z użyciem białek rekombinowanych produkowanych w systemach bakteryjnych, oferując **uniwersalną metodykę** ich oczyszczania i monitorowania zanieczyszczeń.

Następnie, za pomocą **dichroizmu kołowego** (CD) zidentyfikowana została struktura drugorzędowa uzyskanych produktów, potwierdzono stan natywny (brak oznak denaturacji) jak również oceniona została ich stabilność. Ocena energii denaturacji w obecności chlorowodoru guanidyny pozwoliła zidentyfikować najbardziej (gp24) oraz najmniej (gpSoc) stabilne białko kapsydu. Ich zdolność do oligomeryzacji została dodatkowo oceniona metodą **dynamicznego rozproszenia światła** (dynamic light scattering), ujawniając zdolność do spontanicznej oligomeryzacji gpSoc.

Praca prezentuje pierwszy kompletny opis właściwości fizykochemicznych białek zewnętrznych kapsydu bakteriofagów z rodziny T4, mediujących oddziaływanie tych fagów ze środowiskiem zewnętrznym, w tym z organizmami ludzi i zwierząt. Oryginalnym wkładem jaki prezentowana praca wnosi w badania bakteriofagów jest także **metodyka produkcji białek wysokooczyszczonych, przeznaczonych do badań immunologicznych lub terapii**. Ustalona metodyka produkcji białek fagowych była też podstawą wykonania pozostałych prac z ich wykorzystaniem.

3. Miernikiewicz P., **Dąbrowska K.**, Piotrowicz A., Owczarek B., Wojas-Turek J., Kicielińska J., Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Hodyra K., Macegoniuk K., Rzewucka K., Kopciuch A, Majka T, Letarov A, Kulikov E., Maciejewski H., Górski A.: T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS ONE* 8(8):e71036, 2013

Wirusy atakujące ludzi i zwierzęta są bardzo często odpowiedzialne za silną aktywację szlaków sygnałowych, prowadzących do **zwiększonej produkcji mediatorów stanu zapalnego**. W organizmie pacjenta dochodzi do wyrzutu cytokin oraz rodników tlenowych (ROS). Zazwyczaj jest to odpowiedź na obecność konkretnych,

rozpoznawanych przez układ odpornościowy białek wirusa. Prezentowana praca miała na celu **odpowieź na pytanie, czy analogiczne procesy zachodzą i są mediowane przez białka wirusów bakteryjnych**. Byłby to ważny i niekorzystny efekt działania bakteriofagów, który musiałby zostać uwzględniony w pracach nad ich zastosowaniem terapeutycznym.

W toku prac oceniona została zdolność wysokooczyszczonych bakteriofagów a także ich izolowanych wysokooczyszczonych białek do indukcji wybranych czynników, których zmiany są charakterystyczne dla procesu zapalnego: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 p40/p70, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, MIG, RANTES, GCSF, GM-CSF. Metodą przesiewowych testów membranowych zbadano produkcję tych czynników *in vivo* w organizmie myszy traktowanych fagami i ich białkami, oraz w krwi ludzkiej *ex vivo*. Ponadto, określono reakcję komórek dendrytycznych wyprowadzonych do hodowli *ex vivo* z mysiego szpiku; zbadano ekspresję powierzchniową CD40, CD80, CD86 oraz MHC klasy II. Określono też tzw. wybuch tlenowy (ROS) metodą chemiluminescencji z luminolem, w komórkach krwi.

Żadne z przebadanych czynników związanych z reakcją zapalną nie były pobudzone przez bakteriofagi ani ich izolowane białka kapsydowe. Obserwacja ta wnosi istotny wkład w pozytywną ocenę bezpieczeństwa stosowania bakteriofagów w terapii, zarówno u ludzi jak i u zwierząt.

4. Ceglarek I., Piotrowicz A., Lecion D., Miernikiewicz P., Owczarek B., Hodyra K., Harhala M., Górski A., **Dąbrowska K.**: A novel approach for separating bacteriophages from contaminating bacteriophages of other types using affinity chromatography combined with competitive phage display. *Scientific Reports* 3, 3220, 2013

Praca przedstawia **rozwiązanie nowego rozwiązania technologicznego opisanego w publikacji Oślizło i wsp. 2011 BMC Biotechnology**. Nowością jest opracowanie metodyki pozwalającej na modyfikację kapsydu fagowego **bez jakichkolwiek manipulacji w genomie bakteriofaga**. Ma to podstawowe znaczenie dla perspektywy zastosowania tego rozwiązania w praktyce, ponieważ wszelkie manipulacje w genomach muszą być zakwalifikowane jako wytworzenie GMO (organizmów genetycznie modyfikowanych). Ewentualne wdrożenie produktów, szczególnie produktów leczniczych, opartych na GMO musi napotkać na bardzo poważne przeszkody formalne a także na opór konsumentów i

wątpliwości etyczne. Dlatego **technologia pozwalająca modyfikować kapsydy bez zmian w genomach fagowych ma duży potencjał aplikacyjny, wykraczający zdecydowanie poza samo oczyszczanie fagów**; phage display jest bowiem proponowany jako metoda produkcji szczepionek, preparatów przeciwnowotworowych, i in.

W pracy wprowadzono pojęcie kompetytywnego 'phage display', opartego na jednoczesnym (konkurencyjnym) wbudowywaniu do kapsydu białek natywnych ekspresjonowanych z genomów bakteriofagowych oraz białek rekombinowanych, ekspresjonowanych z towarzyszących wektorów plazmidowych, wprowadzonych do komórek gospodarza. Metoda umożliwia oczyszczanie bakteriofagów do poziomu czystości odpowiedniej do badań immunologicznych. W pracy wykazano ponadto, że **metoda ta umożliwia oczyszczenie wybranego szczepu bakteriofagowego w przypadku kontaminacji drugim, podobnym szczepem bakteriofagowym**. Dostępne dotychczas metody nie oferowały takiej możliwości.

Praca zaowocowała też zgłoszeniem patentowym, na które uzyskano finansowanie w ramach projektu POIG, zgłoszenia P392774 i PCT WO2012/057643A1.

5. Kaźmierczak Z., Piotrowicz A., Owczarek B., Hodyra K., Miernikiewicz P., Lecion D, Harhala M., Górski A., **Dąbrowska K.**: Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. *Bacteriophage* 4(1):e28364, 2014

Praca przedstawia **nową metodę obrazowania molekularnego bakteriofagów w tkankach i komórkach** (np. makrofagach), opartą na phage display białek fluorescencyjnych. Jest ona odpowiedzią na potrzebę, jaką stwarzają rozwijające się badania farmakokinetyki fagów oraz ich bezpośrednich interakcji z komórkami ssaków.

Zielone białko fluorescencyjne (green fluorescent protein, GFP) zostało zaprezentowane na powierzchni bakteriofaga w formie fuzji z białkiem Hoc. Tak przygotowane bakteriofagi zostały oczyszczone, potwierdzono ich fluorescencję, a następnie zwizualizowane poprzez detekcję fluorescencji w tkankach mysich po podaniu dożylnym (śledziona, węzły chłonne) lub w makrofagach (inkubacja komórek z fagiem *in vitro*).

Jest to pierwszy raport prezentujący fluorescencyjną wizualizację bakteriofagów obecnych w żywych komórkach lub tkankach.

6. Gamkrelidze M., **Dąbrowska K.**: T4 bacteriophage as a phage display platform. *Archives of Microbiology* 196(7):473-9, 2014

Praca przedstawia przekrojową analizę i podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat techniki phage display stosowanej na platformach pochodzących z rodziny T4. W pracy położony został szczególny nacisk na praktyczne aspekty zagadnienia, proponując autorską analizę możliwości płynących z wykorzystania tego typu platform w porównaniu do klasycznego podejścia bazującego na fagach filamentowych, pochodzących z grupy M13. Praca integruje także aktualny stan wiedzy metodycznej oraz przedstawia zastosowania techniki w różnych gałęziach biotechnologii.

7. **Dąbrowska K.**, Kaźmierczak Z., Majewska J., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Wietrzyk J., Lecion D., Hodyra K., Nasulewicz-Goldeman A., Owczarek B., Górski A.: Bacteriophages displaying anticancer peptides in combined antibacterial and anticancer treatment. *Future Microbiology* 9(7), 861–869 2014

Praca przedstawia ocenę możliwości zastosowania bakteriofagów prezentujących anty-nowotworowe peptydy do **jednoczesnej terapii przeciwnowotworowej oraz przeciwbakteryjnej**. Bakteriofagi zostały zmodyfikowane metodą 'phage display', dzięki czemu prezentowały na swojej powierzchni obcy peptyd pochodzący z lamininy: YIGSR. Jednocześnie zachowały swoją naturalną zdolność do zabijania bakterii *Escherichia coli*.

W pracy zastosowano model mysiej infekcji pooperacyjnej przy jednoczesnym wzroście guza nowotworowego. Nowotwór to mysia rak sutka 4T1, myszy BALB/c. Uzyskano wyczuwalne guzy u badanych zwierząt, a następnie poddano je operacji polegającej na nacięciu skóry i guza, po czym ranę opatrzono szwem chirurgicznym. Taki układ doświadczalny jest modelem nieudanej operacji usunięcia guza, po której następuje wzrost wznowy nowotworowej. Ranę zakażano śródoperacyjnie bakterią *Escherichia coli*. U tak przygotowanych zwierząt następował dalszy wzrost guza oraz utrzymywała się infekcja. Zwierzętom podawano modyfikowane bakteriofagi prezentujące peptydy YIGSR lub fagi kontrolne.

Stwierdzono zahamowanie wzrostu guzów u myszy traktowanych modyfikowanymi bakteriofagami w porównaniu do myszy kontrolnych. Również rozwój infekcji w ranie został zahamowany u myszy traktowanych wszystkimi rodzajami bakteriofagów.

Mimo dużej popularności techniki ‘phage display’ w badaniach nad peptydami i białkami o działaniu przeciwnowotworowym, **jest to pierwsza praca, w której poddano ocenie i wykazano możliwość jednoczesnego działania przeciwnowotworowego (modyfikacja molekularna) oraz działania przeciwbakteryjnego (naturalna aktywność bakteriofagów).**

8. **Dąbrowska K**, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, Kaźmierczak Z, Letarov A, Górski A: Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *Journal of Virology* 2014

Immunogenność bakteriofagów jest jednym z głównych czynników decydujących o ich losie *in vivo*; ma wpływ na utratę aktywności i usuwanie cząstek fagowych, a przez to ogranicza ich zdolność do niszczenia bakterii. Przeprowadziłam analizę porównawczą immunogenności poszczególnych białek tworzących powierzchnię główki bakteriofaga T4, wraz z oceną wpływu przeciwciał o określonej specyficzności na aktywność bakteriofagów *in vitro* oraz *in vivo* w przebiegu infekcji bakteryjnej. Wykorzystane zostały wysokooczyszczone białka kapsydowe oraz wysokooczyszczone bakteriofagi, które testowano w modelu mysim oraz z użyciem ludzkich surowic. Wykazane zostało kluczowe znaczenie głównego białka kapsydu (Major Capsid Protein, gp23) w immunizacji populacji ludzkiej przeciwko T4. Do tej pory jako najsilniej immunogenne białko kapsydu wskazywano białko Hoc ze względu na jego nazwę (Highly Immunogenic Outer Capsid Protein). W swojej pracy dotarłam do źródeł tej nazwy, t.j. do oryginalnej japońskiej pracy autorstwa Ishii i Yanagida (1974); nazwa została nadana w oparciu o porównanie wyłącznie z jednym, wybranym białkiem (gpSoc), co więcej: wyizolowanym z kapsydu, bez możliwości oceny immunogenności białek w całej strukturze faga. Dlatego przedstawiona praca wnosi oryginalny wkład w rozumienie, a nawet obala obiegowe, nieuzasadnione przekonania co do **rozkładu najważniejszych elementów immunogennych na kapsydzie T4**. Ponadto, nowością jest **wykazanie, że przeciwciała specyficzne do białek główki mogą neutralizować aktywność bakteriofagów**. Nowym elementem w tej pracy jest również **wykazanie roli układu dopełniacza w inaktywowaniu bakteriofagów**, co wskazuje na ograniczone podobieństwo pomiędzy procesami decydującymi o usuwaniu z organizmów niepatogennych wirusów bakteryjnych i tych zaangażowanych w usuwanie i neutralizację patogennych wirusów ludzi i zwierząt.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Podsumowanie. Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 34 anglojęzycznych pracach opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports w tym **po uzyskaniu stopnia naukowego doktora** współautorstwo w **22** opublikowanych pracach oryginalnych (pierwszy autor - **8** prac, autor korespondencyjny - **9** prac), współautorstwo w **8** pracach przeglądowych. Poza publikacjami naukowymi na dorobek ten składa się **6** referatów wygłoszonych na międzynarodowych konferencjach naukowych (1 na zaproszenie organizatorów konferencji), 28 komunikatów zjazdowych w formie plakatów, 2 patenty krajowe, 1 krajowe zgłoszenie patentowe oraz 4 międzynarodowe zgłoszenia patentowe. Sumaryczny współczynnik wpływu (impact factor) prac oryginalnych wynosi **71,068** (punktacja MNiSW: **735 pkt.**) Do dnia 20 sierpnia 2014 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 298 razy (wyłączono autocytowania) a indeks Hirsh'a wynosi 10. **Łączny IF ośmiu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 25,235.** Ponadto, w ramach działalności naukowej byłam lub jestem kierownikiem 8 projektów badawczych oraz kierownikiem 2 indywidualnych zadań badawczych w projektach wielośrodkowych. Uczestniczyłam też w realizacji kolejnych 6 projektów badawczych (jako wykonawca). Wymienione projekty były lub są finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowe Centrum Nauki, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (w tym 1 projekt którego źródłem finansowania są środki UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka).

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Prowadzoną obecnie tematyką naukową zajmuję się jako studentka Studium Doktoranckiego przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, w Samodzielnym Laboratorium Bakteriofagowym. Wiodącym tematem tego laboratorium jest biologia bakteriofagów, w szczególności jej aspekty mające przełożenie na możliwość praktycznego zastosowania tych wirusów w terapii. Laboratorium ma długą historię badań nad bakteriofagami oraz ich terapeutycznego stosowania, a od roku 2005 działa przy Instytucie jedyny w Unii Europejskiej Ośrodek Terapii Fagowej spełniający formalne wymogi co do prowadzenia fagowej terapii eksperymentalnej.

Moje zainteresowania badawcze od początku koncentrują się na oddziaływaniach wirusów bakteryjnych z organizmami ssaków oraz na potencjalnym wpływie, jaki fagi mogą wywierać na procesy fizjologiczne. Wobec powszechnego zainteresowania oddziaływaniami fag-bakteria, był to kierunek badań nietypowy nie tylko w Polsce, ale i na świecie. Uzasadnieniem dla takiego nietypowego nurtu badawczego jest rola, jaką mogą odgrywać bakteriofagi w leczeniu pacjentów cierpiących na lekooporne zakażenia bakteryjne.

Jednym z ważniejszych tematów podjętych jeszcze w okresie studiów doktoranckich (współpraca z Laboratorium Immunologii Nowotworów IITD), był wpływ bakteriofagów na eksperymentalne procesy nowotworowe. Badania dotyczyły zarówno oddziaływań *in vitro* jak i *in vivo*. W szczególności badałam oddziaływanie adhezyjne fag-komórka oraz wpływ fagów na eksperymentalne procesy nowotworowe w modelach mysich. W tym celu analizowałam potencjału migracyjny komórek, adhezję do macierzy międzykomórkowej oraz innych komórek, ekspresję różnego typu cząstek na powierzchni komórki, analizę faz cyklu komórkowego, prowadziłam testy proliferacyjne, badałam tworzenie przerzutów w organach mysich, wzrost guza litego, a także eksperymentalny homing komórek nowotworowych w płucach (z użyciem komórek znakowanych chemiluminescencyjnie). W celach badawczych ustaliłam linie komórek nowotworowych i prawidłowych znakowanych wybranymi znacznikami, a także wyselekcjonowałam linie o podwyższonym potencjale przerzutowym lub migracyjnym. Badania te pozwoliły m.in. na pierwszą pozytywną ocenę w modelu eksperymentalnym bezpieczeństwa stosowania bakteriofagów w przypadku współwystępującej choroby nowotworowej. Obserwacje te mogą więc zostać wykorzystane w dalszym rozwoju terapii bakteriofagowej (*opublikowano: Acta Virologica 2004, Anticancer Research 2004*).

Fagi są powszechne w organizmach ludzi i zwierząt, ponieważ pasożytują na znajdujących się tam bakteriach, zarówno niepatogennych jak i patogennych. Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły także na zaproponowanie molekularnego szlaku oddziaływania naturalnie występujących bakteriofagów z komórkami śródbłonna ssaków (np. w jelicie); w oddziaływania zaangażowane są najprawdopodobniej receptory integrynowe oraz w przypadków bakteriofagów z rodziny T4 narożne białko kapsydu fagowego zawierające motyw aminokwasowy KGD (homolog RGD) (*częściowo opublikowano: Acta Virologica 2004, Oncology Res. 2005, prace obecnie kontynuowane*).

W toku prac prowadzonych na studiach doktoranckich wyselekcjonowałam unikalny szczep bakteriofaga z rodziny T4, który charakteryzował się zwiększonym powinowactwem do komórek eukariotycznych. Selekcję przeprowadziłam proponując autorską metodę pasażu opartych na adhezji (objęto patentem: *patent polski nr 195815*). Następnie zidentyfikowałam mutację nadającą temu szczepowi jego szczególne cechy oraz wykazałam istotne różnice w farmakokinetyce tego faga w porównaniu do szczepu dzikiego. W ten sposób jako pierwsza wskazałam białko kapsydowe bakteriofaga (gpHoc), którego funkcja w kapsydzie była wcześniej powszechnie uważana za nieznaną, a które okazało się mediuować i modyfikować oddziaływanie tego faga z komórkami ssaków (opublikowano już po obronie doktoratu: *Oncology Research 2005, Archives of Virology 2006, Archives of Microbiology 2007*).

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Podjęty jeszcze podczas studiów doktoranckich kierunek badawczy, jakim była identyfikacja białek strukturalnych determinujących oddziaływanie fagów z organizmami ssaków, kontynuuję i rozwijam do chwili obecnej.

Najważniejsze uzyskane przeze mnie wyniki zostały zawarte w cyklu publikacji naukowych przedstawionych jako proponowana rozprawa habilitacyjna, szczegółowo opisanych w punkcie 3b niniejszego autoreferatu (*strony 5-15*). Poniżej przedstawione zostały najważniejsze zagadnienia wykraczające poza ten cykl, w tym częściowo niepublikowane.

Identyfikacja elementów adhezyjnych kapsydu (względem komórek ssaków, głównie komórek jelita ze względu na typowe środowisko występowania fagów w organizmie) zaowocowała określeniem drugiego białka, które w niektórych warunkach może wchodzić w tego typu interakcje (gpSoc). W tym białku zidentyfikowałam region ok. 20 aminokwasów, który mediuje jego adhezyjny potencjał (*prace zostały wykonane pod moim kierownictwem w ramach pracy magisterskiej mgr. Zuzanny Kaźmierczak (Zawadzkiej)*). Wykonana została również konstrukcja mutantu fagowego pozbawionego tego białka i obecnie trwają prace nad określeniem jego zdolności adhezyjnych, cyrkulacji *in vivo* oraz ewentualnego wpływu na wzrost nowotworów eksperymentalnych.

Jestem również zaangażowana w badanie właściwości białek bakteriofagowych decydujących o fagowej specyficzności (gp12, gp37). Celem jest określenie interakcji tych białek z układem immunologicznym, badanie funkcji przeciwciał specyficznych do tych białek

oraz ewentualnych indukowanych przez nie efektów fizjologicznych, np. produkcji wybranych cytokin. Do tej pory, przy udziale członków prowadzonego przeze mnie zespołu, udało się uzyskać produkty białkowe, dobrze ustalić metodykę pozyskiwania jako produktów rekombinowanych oraz określić fizykochemiczne cechy tych białek, w toku są badania w modelu *in vivo* (prace magisterskie: mgr Piotr Szkuta, mgr Ryszard Soluch).

Problem produkcji przeciwciał w odpowiedzi na obecność bakteriofagów w organizmie był przedmiotem jednej z prac cyklu habilitacyjnego (*Journal of Virology* 2014). Kontynuacją tego tematu jest badana obecnie pod moim kierunkiem identyfikacja różnic w produkcji i charakterystyce indukowanych przeciwciał w zależności od drogi i schematu podania a także od charakterystyki molekularnej bakteriofagów (model myszy). Dodatkowo uwzględniona została charakterystyka statusu mikrobiologicznego badanych zwierząt. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że aplikacja dużych bakteriofagów *per os* nie pozwala na ich skuteczne przenikanie do krwi, ale obserwowana jest ich stała obecność w jelicie w wysokich stężeniach, a długotrwałe podawanie (w modelu mysim 100 dni) pozwala na skuteczne indukowanie przeciwciał klasy IgG. Co ciekawe, przeciwnie do oczekiwań, brak jest istotnych zmian w charakterystyce bakterii zasiedlających jelito. Występują też istotne różnice pomiędzy poszczególnymi białkami kapsydu w ich efektywności w indukowaniu przeciwciał, szczególna immunogenność wykazuje główne białko kapsydu gp23 (praca w przygotowaniu).

Swoje badania rozszerzyłam też na szczepy bakteriofagów terapeutycznych stosowanych w Ośrodku Terapii Fagowej przy Instytucie. Prace rozpoczęłam w ramach dwóch projektów pozyskanych niedawno z Narodowego Centrum Nauki (Sonata Bis oraz Harmonia). Pierwszy z projektów zmierza do identyfikacji wpływu jaki terapeutyczne bakteriofagi wywierają na organizmy ssaków na poziomie szlaków wewnątrzkomórkowych, drugi jest poświęcony charakterystyce i modyfikacjom głównych determinant antygenowych w grupie bakteriofagów terapeutycznych aktywnych przeciwko bakteriom *Pseudomonas*. W obu wypadkach prace badawcze są obecnie w toku.

Wrocław,
20 sierpnia 2014

data

Krzyszyna
Dąbrowycka

podpis