Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

INSTYTUT GENETYKI I MIKROBIOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 13 | +48 71 325 21 51
fax +48 325 21 51

igm@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 18.07.2017
L. dz. 327/2017

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290
fax. +48 71 325 21 51
email. zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl

Wrocław, 2017-07-14

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Hodyry-Stefaniak

pt. „Immunogenność bakteriofagów z grupy PB1 u człowieka i w modelu mysim."

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Hodyry-Stefaniak, została wykonana pod kierunkiem dr hab. Krystyny Dąbrowskiej w Samodzielnym Laboratorium Bakteriofagowym, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Praca poświęcona jest badaniom dotyczącym immunogenność wybranych bakteriofagów *Pseudomonas* z grupy PB1 oraz białek strukturalnych tych fagów, w modelu mysim i u człowieka.

Badania były realizowane w ramach grantu NCN Harmonia UMO-2013/08/M/NZ6/01022 „Identyfikacja cech molekularnych warunkujących immunogenność bakteriofagów z grupy PB1 aktywnej przeciwko *Pseudomonas*". Natomiast część wyników zostało opublikowanych w pracy: Hodyra-Stefaniak et al., Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*. Scientific Report 2015, 5:14802. Praca ta została wyróżniona w ogólnopolskim konkursie im prof. K. Bassalika na najlepsze polskie prace mikrobiologiczne opublikowane w 2015 roku.

Pseudomonas aeruginosa jest bakterią oportunistyczną wywołującą ciężkie i przetrwałe infekcje zarówno u ludzi jak i zwierząt. Bakteria ta zaliczana jest to antybiotykoopornej grupy ESKAPE. Badania dotyczące efektywności fagów w eradykacji *Pseudomonas* są ważne dla rozwoju terapii fagowej, jako alternatywy dla często nieskutecznych antybiotyków. Jedną z interesujących grup fagów jest rodzaj *Pbunavirus* skupiającą fagi lityczne o wysokiej skuteczności. Niestety, istnieje niewiele doniesień literaturowych opisujących szczegółową budowę tych fagów. Ponadto do chwili obecnej nie przedstawiono żadnych danych pozwalających na powiązanie charakterystyki molekularnej bakteriofagów PB1 z ich reaktywnością immunologiczną.

Celem pracy doktorskiej Pani Katarzyny Hodyry-Stefaniak było zatem porównanie immunogenności wybranych fagów z grupy PB1 (F8, LMA2 i P1) oraz powiązanie występujących różnic tej cechy z różnicami w budowie wybranych białek strukturalnych. Projekt obejmował indukcję przeciwciał przez fagi i wybrane białka strukturalne oraz określenie wpływu specyficznych przeciwciał na aktywność przeciwbakteryjną tych wirusów, a także badanie lokalizacji wybranych białek fagowych.

Chcąc zrealizować powyższe cele wykonano kilka dobrze przemyślanych zadań:

1. Przygotowano rekombinowane oczyszczone białka strukturalne oraz oczyszczone hodowle badanych fagów PB1
2. Wykonano lokalizację strukturalną wybranych białek za pomocą immunomikroskopii elektronowej
3. Scharakteryzowano indukcję specyficznych przeciwciał przez terapeutycznego bakteriofaga F8 na modelu mysim, w tym kinetykę wzbudzania swoistych przeciwciał, wpływ przeciwciał klasy IgM oraz IgG na kinetykę aktywności faga *in vitro* i *in vivo*.
4. Porównano zdolności fagów F8, LMA2 oraz P1 do indukcji specyficznych przeciwciał klasy IgM oraz IgG w modelu mysim oraz określono częstość występowania przeciwciał blokujących te fagi w populacji ludzkiej.
5. Porównano zdolności wybranych białek strukturalnych gp18, gp22, gp29 do indukcji specyficznych przeciwciał w modelu mysim oraz określono częstość występowania przeciwciał blokujących te fagi w grupie osób zdrowych oraz u pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej IITD we Wrocławiu.

Badania były wykonywane na zestawie trzech bakteriofagów z grupy *Pbunavirus*:
(i) F8 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów IITD PAN; (ii) LMA2 z kolekcji prof. Roba Lavigne, KU Leuven, w Belgii oraz (iii) vB_PaeM_CEB_DP1 z kolekcji prof. Joany Azeredo, Uniwersytet Minho w Bradze, w Portugalii. Niestety nie zostały podane numery dostępowe GenBank umożliwiające czytelnikowi prawidłową identyfikację genomów fagowych. Na przykład, w bazie GenBank jest genom faga *Pseudomonas* F8 zdeponowany przez Targanta Therapeutics Inc., Canada, Ville Saint Laurent, ale nie wiadomo, czy jest to ten sam fag, którego użyto w badaniach Doktorantki. Niestety nie znalazłam też genomu faga vB_PaeM_CEB_DP1 w bazach GenBank, dlatego powstaje pytanie skąd Doktorantka miała wiedzę umożliwiająca prawidłowy dobór genów kodujących analogiczne białka u wszystkich trzech fagów. Wydaje się również bardzo istotne podanie numerów referencyjnych GenBank dla wszystkich wybranych do testów białek strukturalnych, zwłaszcza, że wykonywano analizy porównawcze *in silico* sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych oraz zaprojektowano odpowiednie startery niezbędne do produkcji białek rekombinowanych.
W opisie celu pracy lub rozdziale materiały i metody nie sprecyzowano jakie białka strukturalne (mam na myśli jakie elementy kapsydu) będą stanowić sedno badań (podano tylko numery gp) i dlaczego akurat te białka wybrano do badań immunogenności. Sytuacja trochę się wyjaśnia przy omawianiu wyników i w dyskusji.
Kontynuując myśl, warto byłoby zrobić tabelę porównawczą w wynikach zestawiającą identyfikację funkcji wybranych białek wykonaną przy użyciu narzędzi informatycznych (np. gp29 faga LMA2 opisanego jako „putative structural protein") z wynikami analiz immunomikroskopii pozwalających na precyzyjne umiejscowienie typowanego białka w obrębie kapsydu fagowego. Takie zestawienie podkreśliłoby wagę uzyskanych przez Doktorantkę wyników, które weryfikują przypuszczalne funkcje wybranych białek.
W pracy wykorzystano szereg metod z zakresu biologii molekularnej (produkcja białek rekombinowanych), mikrobiologii (hodowla bakteriofagów, analizy mikroskopowe), immunologii (indukcja i oznaczanie poziomów przeciwciał oraz neutralizacji fagów) oraz badania *in vivo* na modelu mysim. Wybór metodologii uważam za bardzo dobrze uzasadniony, nie tylko merytorycznie w/w potrzebami, ale także godnym uznania przygotowaniem merytorycznym i praktycznym Doktorantki. Pragnę również podkreślić, że jestem pod wrażeniem ogromu pracy jaka została wykonana w dwóch najważniejszych i najbardziej pracochłonnych etapach doktoratu, tzn. przy przygotowaniu i optymalizacji ekspresji białek strukturalnych oraz w badaniach *in vivo*, które wymagały tytanicznej

pracy i precyzyjnej organizacji działania przy kolekcjonowaniu i analizie próbek pochodzących z 22 punktów czasowych od momentu podania preparatu myszom aż do 142 doby.

Co do formalnej strony dysertacji, Pani mgr Katarzyna Hodyra-Stefaniak, zastosowała układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 161 stron, w tym 42 ryciny, 13 tabel oraz 148 pozycji bibliograficznych, głównie anglojęzycznych. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatnie do prezentowanych treści. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym unikającym żargonu naukowego lub zapożyczeń językowych. Mam drobną sugestię co do wstępu pracy, w którym zabrakło mi pomocniczych rycin np. przedstawiającej budowę wirionu faga PB1 z zaznaczeniem kluczowych białek strukturalnych stanowiących przedmiot rozprawy, czy rycin prezentujących schemat działania odpowiedzi wrodzonej i swoistej układu immunologicznego, w tym prezentacja antygenu, aktywacja układu dopełniacza.

Rozdział metody zawiera aż czterdzieści podpunktów, które moim zdaniem można byłoby scalić w większe grupy np. ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych mogła zawierać elementy 4.10-4.21; lub immunomikroskopia fagów (4.35-4.38).

Zauważyłam też parę niedociągnięć np. w Tabeli 5.3 i 5.4 nie określono rodzaju analizowanej sekwencji (nukleotydowej czy aminokwasowej) oraz nie sprecyzowano rodzaju użytego programu (BLASTN czy BLASTP). Tabela 5.10 opisująca pacjentów i rodzaj stosowanej terapii mogła się znaleźć w rozdziale materiały.

Pomimo drobnych uchybień, Pani Katarzyna szczegółowo i metodycznie przedstawia założenia projektu i kierunek podejmowanych kolejnych kroków pracy badawczej, oraz konsekwentnie realizuje i omawia wszystkie rezultaty swoich badań. Świadczy to o dojrzałym podejściu naukowca do zalet, ale i też ograniczeń dostępnych metod. Płynnie poprowadzono narrację od wyczerpującego wstępu, poprzez założenia i cel pracy, poprzez metodologię, wyniki, dyskusję, aż do końcowych wniosków.

W mojej opinii, Doktorantka wykazała się umiejętnością syntetycznego przedstawiania dużej ilości wyników uzyskanych przy zastosowaniu wielu metod badawczych i analiz porównawczych. Postawione cele omawianej pracy zostały osiągnięte z bardzo dobrym skutkiem. Uzyskane, zgodnie z założeniem, pozwoliły Autorce na wysnucie bardziej ogólnych wniosków, które przejrzyście przedstawiła w rozdziale 7 wypunktowując je w dziewięciu elementach.

Projekt Pani Katarzyny stanowi pierwszą próbę powiązania cech budowy kapsydów bakteriofagów z grupy PB1 z ich immunogennością, która została podjęta w temacie terapii fagowej. Pełna wiedza dotycząca

interakcji fagów z układem immunologicznym może pozytywnie wpłynąć na optymalizację doboru danego faga do sytuacji konkretnego pacjenta, w tym jego statusu immunologicznego, w celu zastosowania jak najkorzystniejszego rozwiązania terapeutycznego.

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą, jestem przekonana, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników, z dużym nadmiarem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Nie mam istotnych zastrzeżeń do merytorycznej strony pracy. Przeprowadzenie tych badań dowodzi osiągnięcia dużych umiejętności Doktorantki w poprawnym posługiwaniu się nowoczesnymi metodami badawczymi oraz kompetentnej interpretacji uzyskiwanych rezultatów. Duża wartość naukowa projektu została znakomicie potwierdzona przez publikację wyników w specjalistycznym czasopiśmie z listy filadelfijskiej Scientific Report (IF 4,259).

Z formalnego obowiązku recenzenta odnotowuję zauważone, nieścisłości i niedostatki edytorskie i pragnę zadać Doktorantce parę pytań jakie nasunęły mi się w trakcie czytania tej rozprawy.

1. Pytanie techniczne dotyczące Ryc. 5.3: Proszę o wyjaśnienie, dlaczego produkty PCR P18, P22 oraz P29 różnią się wielkością od homologicznych produktów białek fagów F8 i LMA2
2. Czy faktycznie efekt wyższego naturalnego poziomu przeciwciał anty-T4 w stosunku do anty-PB1 świadczy o tym, że badane w pracy bakteriofagi z grupy PB1 są znacznie lepszymi (niż T4) kandydatami jako fagi terapeutyczne? Czy może jest też inne wytłumaczenie takiej sytuacji?
3. Zdaniem Doktorantki, jakie fagi są potencjalnie bardziej obiecujące w terapii: posiadające mały genom (50-70kbp), średni genom (150-180 kbp), czy może fagi giganty (ok. 300-400 kbp)? Prosiłabym o rozważenie problemu pod kątem potencjału litycznego i immunogenności.
4. Zdaniem Doktorantki, jaka jest przyszłość fagoterapii? Czy będzie to ogólnie dostępna terapia alternatywna? Czy może większe nadzieje wiąże się z zastosowanie np. białkowych preparatów fagowych? Prosiłabym o rozważenie problemu pod kątem obecnych przepisów o dopuszczaniu leków do obrotu oraz zalet i ograniczeń w przygotowywaniu preparatów fagowych.

Podsumowanie.

Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą. Zamierzenia badawcze zostały osiągnięte. Wyniki badań i wysnute z nich wnioski przedstawione w rozprawie, mają dużą wartość naukową. Rozprawa została napisana poprawnie i przejrzyście pod względem językowym i edytorskim. Zauważone błędy i moja krytyka strony edytorskiej (być może polemiczna) nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Pani mgr Katarzyna Hodyra-Stefaniak wykazała się bardzo szeroką wiedzą podstawową, jak i wiedzą specjalistyczną w tematyce terapii fagowej oraz dużymi umiejętnościami stosowania badawczych metod i technik w zakresie współczesnej mikrobiologii, immunologii i biologii molekularnej.

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Hodyry-Stefaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, ze rozprawa doktorska odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (jt. Dz.U. z 2016 r., poz. 882 ze zm.).

Wnioskuję również o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani Katarzyny Hodyry-Stefaniak zgodnie z wytycznymi regulaminu Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Prof. Zuzanna Drulis-Kawa

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Patogenów
i Immunologii

prof dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa