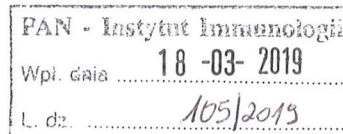




Dr hab. Małgorzata Łobocka,
Zakład Biochemii Drobnoustrojów,
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Ul. Pawińskiego 5A,
02-106 Warszawa,
Tel.: 022-592-1300 lub 022-592-1303,
Fax: 022-592-2190
E-mail: lobocka@ibb.waw.pl



Warszawa, 12. 03. 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Miernikiewicz pt.: „**Ocena zdolności białek kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej**”

Promotor: dr hab. Krystyna Dąbrowska (Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu)

Coraz większe zainteresowanie bakteriofagami jako potencjalnymi środkami antybakteryjnymi alternatywnymi dla antybiotyków, możliwymi do stosowania w zwalczaniu infekcji antybiotykoopornymi bakteriami, narzuca konieczność odpowiedzi na wiele pytań dotyczących biologii bakteriofagów, ich interakcji z bakteriami, a także interakcji z komórkami eukariotycznymi i wpływu na organizmy ludzi i zwierząt tworzące środowisko oddziaływań bakteriofagów z bakteriami w trakcie terapii. Pionierem w tych badaniach jest grupa prof. dr hab. Andrzeja Górskiego, a także wchodzący w skład tej grupy zespół dr hab. Krystyny Dąbrowskiej, wychowanki profesora, pełniącej funkcję promotora rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Miernikiewicz zatytułowanej „Ocena zdolności białek kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej”. Pytania jakie postawiła sobie mgr Paulina Miernikiewicz rozpoczynając badania były bardzo konkretne i dotyczyły potencjalnego udziału bakteriofaga T4 i jego wybranych białek w stymulacji reakcji zapalnej i jej mediatorów. Bakteriofag T4 został wybrany nieprzypadkowo. Jest on nie tylko modelowym bakteriofagiem *Escherichia coli* i

przedstawicielem większej grupy bakteriofagów o potencjale terapeutycznym, ale też od wielu lat stanowi obiekt badań zespołu dr hab. Krystyny Dąbrowskiej. Jako obiekty badań porównawczych wykorzystano bakteriofagi A3/R i 676/Z pozyskiwane z komórek bakterii Gram-dodatniej - *Staphylococcus aureus*, a więc z natury pozbawione zanieczyszczeń lipopolisacharydem, którego obecność w preparatach bakteriofagów bakterii Gram-ujemnych może powodować reakcje zapalną.

Praca została wykonana w Laboratorium Bakteriofagowym Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, z wykorzystaniem szeregu metod, które zostały opracowane lub też zoptymalizowane w trakcie wcześniejszych badań prowadzonych w Laboratorium.

Większość wyników przedstawionych przez Autorkę została wcześniej opublikowana w trzech publikacjach w czasopismach z listy Web of Science, dwóch w czasopiśmie Plos ONE (w 2012 i 2013 roku) oraz jednej w czasopiśmie Frontiers in Microbiology (w 2016) roku), została więc wcześniej poddana wnikliwym recenzjom. Pierwszym Autorem wszystkich prac jest mgr Paulina Miernikiewicz. Wszystkie wymienione czasopisma posiadają znaczący współczynnik oddziaływania (impact factor, IF) - IF Plos One wynosi 2,776, a IF Frontiers in Microbiology 4,076. O wartości naukowej zaprezentowanych wyników świadczy też liczba cytowań przedstawionych prac - w sumie 52 cytowania. Z tego względu nie jest dla mnie jasne, dlaczego obrona odbędzie się na podstawie obszernej rozprawy doktorskiej, a nie na podstawie tzw. zsywki, stanowiącej przewodnik po opublikowanych pracach, co jest od pewnego czasu dopuszczoną prawnie formą. Chociaż wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Pauliny Miernikiewicz, nie są wszystkimi opisanymi we wspomnianych publikacjach, zapewne z uwagi na współautorstwo innych osób, porównanie zawartości publikacji z zawartością rozprawy doktorskiej wskazuje, że są one głównymi wynikami tych publikacji, stanowiącymi o ich wartości naukowej. W przypadku publikacji w czasopiśmie Frontiers in Microbiology, taką informację zawiera też notatka w publikacji o wkładzie poszczególnych Autorów w tworzenie pracy.

Wyniki zawarte w pierwszej publikacji, a także w pierwszej części wyników opisanych w rozprawie można uznać za wstępne, umożliwiające dopiero podjęcie dalszych badań. Dotyczyły one pozyskania w dużej ilości i w wysokooczyszczonej formie białek gp23*, gp24*, Hoc i Soc faga T4 tworzących kapsyd i eksponowanych na jego powierzchni. Źródłem białek były skonstruowane przez Autorkę pracy z wykorzystaniem standardowych metod i komercyjnych wektorów ekspresyjnych plazmidy niosące pożądane geny w fuzji ze znacznikiem GST lub znacznikiem sześciohistydynowym. Wiele pracy wymagało dobranie odpowiednich wektorów i odpowiedniej lokalizacji znaczników (na końcu N lub na końcu C białka), a także takich warunków hodowli komórek z plazmidami zawierającymi sklonowane geny, by uzyskać pożądane tempo i poziom

syntezy ich produktów. Najciekawszym rozwiązaniem zaprezentowanym w tej pracy jest jednak współprodukcja badanych białek faga T4 z fagowymi lub komórkowymi białkami opiekuńczymi, w tym m. in. w przypadku hodowli komórek w obniżonej temperaturze z białkami opiekuńczymi bakterii psychrofilnych. Pozwoliło to na pozyskanie dużej frakcji badanych białek w rozpuszczalnej formie. Dodatkowo, Autorka poprzez wielokrotne dodatkowe oczyszczanie uzyskała preparaty o bardzo małej zawartości LPS - warunek konieczny, by można było badać ich wpływ na poziom mediatorów stanu zapalnego i wywoływanie reakcji zapalnej z wyłączeniem udziału LPS w tym procesie. Mimo wysokiego stopnia oczyszczenia wymienionych białek, na zdjęciach żeli wykonanych po ich rozdzieleniu elektroforetycznym, widać słabe dodatkowe prążki, sugerujące produkty rozpadu badanych białek lub zanieczyszczenia innymi białkami. Szkoda, że nie przeanalizowano składu białkowego preparatów z wykorzystaniem spektrometrii mas. Ze względu na powoływanie się Autorki w rozdziale Materiały i Metody, na szereg metod opracowanych w Laboratorium Bakteriofagowym, prosiłabym o dodatkowe wyjaśnienie, które z procedur opisanych w części dotyczącej oczyszczania białek były oryginalnym wkładem Autorki, a które powtórzeniem procedur już wcześniej opracowanych i sprawdzonych, użytych przez Autorkę tylko dla pozyskania badanych białek w większej ilości, tym bardziej, że praca ta została również włączona do głównego osiągnięcia w przewodzie habilitacyjnym promotora pracy mgr Pauliny Miernikiewicz, dr hab. Krystyny Dąbrowskiej.

Za najważniejsze osiągnięcia mgr Pauliny Miernikiewicz uważam wyniki opisane w dalszej części pracy i zawarte w dwóch pozostałych publikacjach. Autorka wykazała w nich, że ani oczyszczone przez nią białka, ani całe wiriony faga T4, również oczyszczone z LPS, nie stymulują w istotny sposób reakcji zapalnej. Podobny wynik otrzymała w równoległych badaniach wpływu na reakcję zapalną dwóch niespokrewnionych z T4 bakteriofagów gronkowca złocistego, A3R i 676Z. W badaniach wykorzystwała szeroki zakres wskaźników stanu zapalnego, takich jak mysie i ludzkie cytokiny zapalne, chemokiny, czynniki wzrostu, czynniki związane z alergią i cząstki adhezyjne, a także produkcja reaktywnych form tlenu przez komórki jednojądrzaste i wielojądrzaste krwi obwodowej oraz działanie układu dopełniacza. Wyciągnięte wnioski są więc dobrze udokumentowane i spójne. Na uwagę zasługuje pionierski charakter wykonanych badań i zasadnicze znaczenie ich wyników dla przyszłego rozwoju fagoterapii, dzięki pokazaniu bezpieczeństwa stosowania terapeutycznego fagów badanych przez Autorkę i z dużym prawdopodobieństwem również wielu innych fagów. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami klinicznymi opisanymi w pracach zespołu prof. Andrzeja Górskiego. W dalszej części wyników opisanych w rozprawie oraz w trzeciej z opublikowanych prac Autorka uzyskała wysoce oczyszczony, aktywny biologicznie preparat białka haczyków płytki podstawowej faga T4,

gp12, naturalnie oddziałującego z LPS w procesie adsorpcji faga do bakterii. Wykazała, że oczyszczone białko gp12 po podaniu myszom łącznie z LPS w istotny sposób zmniejsza stymulowaną przez LPS reakcję zapalną. Ten wynik może mieć olbrzymie znaczenie praktyczne, przyczyniając się w przyszłości do opracowania leków łagodzących stan zapalny wywołany ogólnoustrojowym zakażeniem bakteryjnym prowadzącym do sepsy. Stąd mam pytanie do Autorki, czy planuje dalsze badania, które pozwoliłyby wyodrębnić z gp12, krótki peptyd o zachowanej zdolności do wiązania LPS.

Rozprawa zawiera się na 192 stronach tekstu, uzupełnionego 42 rysunkami i 13 tabelami. Jest napisana zwięźle i logicznie, bardzo starannie przygotowana i łatwa w czytaniu, mimo szeregu opisów kompleksowych reakcji leżących u podłoża stanów zapalnych, konstrukcji plazmidów czy też testów immunologicznych *in vitro* i *in vivo*. We wstępie Autorka przedstawia ogólną charakterystykę stanu zapalnego, wyodrębnia stan ostry i przewlekły, opisuje przebieg poszczególnych etapów oraz czynniki wewnątrz- i pozaustrojowe biorące udział w wywoływaniu i wygaszaniu stanu zapalnego, kładąc szczególny nacisk na stany zapalne wywołane przez zakażenia bakteryjne. Opisuje szczegółowo czynniki bakteryjne odpowiedzialne za reakcję zapalną, szczególnie dużo uwagi poświęcając roli LPS w wywoływaniu tej reakcji. Tutaj przydałby się jeszcze graficzny schemat reakcji zapalnych indukowanych przez LPS, co ułatwiłoby prześledzenie tych złożonych reakcji i ich wzajemnych powiązań. Końcowy fragment wstępu poświęcony jest bakteriofagom i nawiązuje bezpośrednio do ich wykorzystania w leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz związanymi z tym kluczowymi pytaniami dotyczącymi możliwości indukowania reakcji zapalnej przez bakteriofagi - aspektu badań nad terapią fagową o tyle istotnego, że w terapiach z wykorzystaniem preparatów fagowych z nawet niewielką domieszką zanieczyszczeń bakteryjnych trudno odróżnić efekt terapeutyczny związany z bakteriobójczymi właściwościami fagów od efektu związanego ze stymulacją odpowiedzi immunologicznej przez resztki bakterii zawarte w preparatach. Wstęp doskonale wprowadza w zagadnienia poruszane w dalszych częściach pracy. Uważam, że mógłby, po uzupełnieniu dodatkowymi graficznymi schematami stać się podstawą krótkiej pracy przeglądowej. Muszę jedynie zganić Autorkę za błędy w Rysunku 1 (str. 37) i towarzyszącym mu opisie. Zawarty na tym rysunku schemat przedstawia strukturę osłon komórkowych typowej bakterii Gram-ujemnej, włączając błonę cytoplazmatyczną, złożoną z peptydoglikanu ścianę komórkową i zewnętrzną błonę komórkową, co nie jest zgodne z podpisem wskazującym, że jest to budowa ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Dodatkowo, na rysunku zewnętrzną błonę komórkową Autorka oznaczyła jako ścianę komórkową, a w opisie stwierdziła, że LPS występuje w zewnętrznej części ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, zapominając, że u bakterii Gram-ujemnych ściana komórkowa jest odgraniczona od środowiska

zewnętrzną błoną komórkową, i to właśnie w zewnętrznej błonie komórkowej zakotwiczony jest LPS. Dodatkowo, prosiłabym o wyjaśnienie, co Autorka miała dokładnie na myśli pisząc na str. 46 wstępu, że fagi mogą przywracać wrażliwość na antybiotyki bakteriom opornym na antybiotyki. Czy nie jest to aby zbyt duży skrót myślowy?

Liczba i różnorodność metod zastosowanych z sukcesem w pracy świadczy o dużej swobodzie Autorki w posługiwaniu się zarówno standardowymi jak i nowoczesnymi technikami mikrobiologii, biologii molekularnej i immunologii. Opis metod zawarty jest aż na 55 stronach tekstu, poczynawszy od izolacji i oczyszczania z LPS bakteriofagów i konstrukcji plazmidów, poprzez wielostopniowe procedury optymalizacji produkcji i oczyszczania białek, a skończywszy na technikach immunologicznych. Cała część pracy opisująca wyniki badań jest zwięzła i logicznie uporządkowana, poczynając od opisu konstrukcji plazmidów i optymalizacji produkcji pożądanych białek, poprzez ich oczyszczanie i wykorzystanie w badaniach nad wpływem na reakcję zapalną. Imponuje determinacja Autorki w dążeniu do skonstruowania plazmidów umożliwiających wydajną ekspresję badanych genów faga T4, a także w optymalizacji produkcji białek kodowanych przez te geny, tak by można było pozyskać badane białka w dużej ilości i w rozpuszczalnej formie. Polemizowałabym jedynie z kolejnością opisu niektórych wyników. Wyniki pokazujące brak aktywności wirionów faga T4 w stymulacji reakcji zapalnej umieszczone są w pracy za wynikami dotyczącymi wpływu oczyszczonych białek wirionu T4 na reakcję zapalną. Tymczasem wskazują one, że nic co jest eksponowane na powierzchni bakteriofaga T4 nie stymuluje w istotny sposób reakcji zapalnej. Badania z oczyszczonymi białkami mogą jedynie to potwierdzić i wskazać, że badane białka, nawet jeśli znajdują się w organizmie w dużej ilości jako produkty rozpadu wirionów lub komórek bakteryjnych z niedojrzałymi fagami, nie będą stymulowały reakcji zapalnej. Ciekawa obserwacja wyniknęła z badań nad wpływem faga T4 i jego mutantu HAPI, a także fagów A3R i 676Z, na aktywność układu dopełniacza, wskazujących na obniżenie aktywności różnych ścieżek układu dopełniacza przez mutant HAPI oraz fagi A3R i 676Z, w porównaniu z dzikim fagiem T4. Nie jest jednak jasne jakich badań wymagałoby wyjaśnienie zaobserwowanych różnic, choć spekulacje na temat przyczyn różnic stanowią obszerną część dyskusji pracy. Choć dyskusja jest zwięzła i odnosi się bezpośrednio do wyników pracy prosiłabym jeszcze Autorkę o odpowiedź na kilka dodatkowych pytań.

- 1) Czym wytłumaczyć bardzo różne poziomy endotoksyny w preparatach oczyszczonych białek gp23*, gp24*, gp12 oraz Hoc i Soc o podobnej lub tylko nieco różnej zawartości białka, wymienionych w Tabeli 13?
- 2) Jak można wytłumaczyć biologiczny sens braku aktywności w wywoływaniu stanu zapalnego przez białka fagowe znane ze swojej immunogenności.

3) Jakich efektów należy oczekiwać przy podaniu myszom z ogólnoustrojowym zakażeniem *E. coli* preparatu gp12 w połączeniu z antybiotykiem?

W mojej opinii rozprawa doktorska mgr Pauliny Miernikiewicz zasługuje na wysoką ocenę, ze względu na pionierski charakter zaprezentowanych badań, właściwy i wszechstronny dobór metod badawczych oraz dużą wartość naukową i aplikacyjną otrzymanych wyników, co potwierdziło ich opublikowanie w renomowanych czasopismach i prezentacje w formie doniesień na międzynarodowych konferencjach.

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o pewnych drobnych niedociągnięciach lub błędach, których Autorka się nie ustrzegła, a których większość zawarta jest w opisie metod i związana z nadużywaniem żargonu laboratoryjnego.

- str. 56: Zamiast żargonowego określenia "szczepy ekspresyjne" lepiej byłoby użyć "Szczepy do ekspresji genów sklonowanych w plazmidach"

- str. 57: "Media hodowlane" to po prostu "Pożywki do hodowli"

- str. 63: Na mapie wektora serii pDONR zaznaczono origin replikacji plazmidu pUC, a na mapach wektorów serii pDEST origin replikacji plazmidu pBR322. Tymczasem jest to ten sam origin replikacji wywodzący się z plazmidu pMB1, a różnica polega na obecności w plazmidach typu pDEST dodatkowo genu *rop* kodującego białko obniżające liczbę kopii tych plazmidów w stosunku do plazmidów typu pDONR.

str. 64: Zamiast żargonowego tytułu podrozdziału "Konstrukcje plazmidowe" lepiej byłoby użyć "Plazmidy niekomercyjne wykorzystane lub skonstruowane w tej pracy"

- str. 67: roztwór octanu sodu i chlorku sodu nie jest buforem

-str. 81: Stwierdzenie "zrównoważony fenol o czystości molekularnej" jest zbyt zdawkowe, by było informatywne dla kogoś, kto nie oczyszczał przedtem DNA z wykorzystaniem fenolu.

str. 86: W opisie elektroforezy Autorka podała skład buforu TBE. Zaraz potem opisała izolację DNA z żeli agarozowych. Czy to znaczy, że do izolacji używane były żele na bazie buforu TBE, zamiast zalecanego w takich przypadkach buforu TAE (Tris-octan, EDTA)

- Podrozdział 5.8, 5.9, 5.10: Podawanie w opisach metod informacji o ilości dodanego do reakcji DNA w mikrolitrach, bez informacji przynajmniej o szacunkowym stężeniu DNA nie określa ile w rzeczywistości DNA znajdowało się w mieszaninie reakcyjnej.

-str. 88: Zamiast żargonowego stwierdzenia "Reakcje restrykcji" poprawniej byłoby zatytułować podrozdział 5.9 "Trawienia enzymami restrykcyjnymi"

- str. 89: bakterii nie transformuje się szokiem termicznym, a DNA.

- str. 91 i 92: Prosiłabym Autorkę o doprecyzowanie określenia "banku ekspresyjnego szczepu bakteryjnego". Zwykle słowa bank w podobnych przypadkach używa się do określenia komórek bakterii zawierających różne fragmenty DNA sklonowane w chromosomie lub plazmidach. Z towarzyszącego stwierdzeniu Autorki opisu nie wynika, że o to tutaj chodzi.
- str. 101-102: W opisie testów przesiewowych z użyciem membran RayBio Cytokine Array Autorka podaje, że wyniki uzyskiwano na podstawie analizy naświetlonych klisz rentgenowskich programem ImageJ. Tymczasem, z zastosowaniem tego typu analizy, wykrycie ponad tysiąckrotnych różnic intensywności sygnału, wskazanych na wykresach słupkowych w podrozdziale 15.1 z wynikami, nie byłoby możliwe ze względu na małą rozpiętość czułości kliszy w warunkach niedoświetlenia wymaganych do pomiarów ilościowych. Tak dokładne pomiary umożliwia tylko wykorzystanie systemów do bezpośredniej detekcji i pomiaru chemiluminescencji. Na użycie takiego właśnie systemu powołano się w opisie tych wyników w publikacji. Prosiłabym Autorkę o wyjaśnienie rozbieżności w opisie systemu pomiaru chemiluminescencji w publikacji i w rozprawie doktorskiej.
- str. 126: białka opiekuńcze nie umożliwiają "powolnej ekspresji innych białek" jak pisze Autorka, lecz ich prawidłowe fałdowanie
- str. 131, Rysunek 24: Część podpisu tego rysunku zawiera przekopiowaną z jednego z poprzednich rysunków błędna informację, że poziomą kreską oznaczono frakcje zawierającą bakteriofagi.

Powyższe, drobne uwagi krytyczne w niczym nie podważają mojej wysokiej oceny pracy. W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy o tytule i stopniach naukowych. Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Pauliny Miernikiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy składam wniosek o jej wyróżnienie.

M. Łobocka