

Dr hab. Marcin Łoś, profesor nadzwyczajny UG
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 12.03.2019

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
WYDZIAŁ BIOLOGII
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
T +48 58 523 60 25, F +48 58 523 60 25

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Miernikiewicz pt. "Ocena zdolności białek
kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej "
przygotowanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Krystyny Dąbrowskiej**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma postać obszernej (192 strony), bardzo starannie przygotowanej monografii o strukturze typowej dla prac doświadczalnych. Składa się ona ze *Spisu rysunków*, *Spisu tabel*, obszernego *Spisu zastosowanych skrótów*, *Wstępu*, który bardzo dobrze wprowadza czytelnika w podstawy tematyki badawczej, jednostronicowego *Celu pracy*, *Materiałów*, *Metod*, *Wyników*, *Dyskusji*, *Wniosków*, *Streszczenia* w wersji polskiej i angielskiej oraz spisu literatury.

Mgr Paulina Miernikiewicz w przedkładanej rozprawie doktorskiej podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę badawczą jaką jest zdolność fagów T4, jego mutantów HAP1, A3R, 676Z oraz białek kapsydu faga T4 – gp23*, gp24*, gp12, Hoc i Soc do modulowania odpowiedzi immunologicznej a w szczególności reakcji zapalnej.

Badania te są bardzo aktualne, ze względu na to, że pozwalają nam znacznie lepiej zrozumieć i przewidzieć interakcję fagów z układem immunologicznym człowieka. Ma to kluczowe znaczenie dla sukcesu fagoterapii, która daje nadzieję na skuteczną walkę z bakteriami antybiotykoopornymi. Mimo tego, iż ta metoda leczenia znana jest dłużej niż antybiotykoterapia, wiele jej aspektów nie jest jeszcze dostatecznie poznanych. Jednym z nich jest wpływ użycia fagów na układ odpornościowy pacjenta, a szczególnie na powstawanie i przebieg reakcji zapalnej. Jest to bardzo istotny aspekt, który jest nieodłącznie związany z leczeniem zakażeń bakteryjnych. Łukę w tych właśnie badaniach stara się zapełnić Mgr. Paulina Miernikiewicz w przedłożonej rozprawie.

Treść wstępu jest dobrze dobrana i stanowi bardzo dobrą teoretyczną podstawę, która pomaga czytelnikowi w interpretacji wyników części doświadczalnej. We wstępie omówione są różne aspekty związane z przebiegiem i czynnikami wywołującymi stan zapalny. W dalszej części wstępu przybliżane są zagadnienia związane z charakterystyką i biosyntezą lipopolisacharydu, a następnie przytoczony jest zwięzły opis użycia bakteriofagów w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych i znanego dotychczas wpływu bakteriofagów na fagocytozę i produkcję cytokin.

Cele pracy są jasno zdefiniowane i zawierają założenia, które wpłynęły na wyznaczenie danych celów. Zdefiniowana jest również hipoteza badawcza, która zakłada, że bakteriofagi, jako wirusy, mogą potencjalnie mieć immunostymulujący charakter podobny do wirusów ludzkich i zwierzęcych, i tym samym, wpływać na produkcję mediatorów stanu zapalnego.

Dobór metod badawczych jest prawidłowy. Pozwoliły one osiągnąć zdefiniowane cele badawcze, przetestować postawioną w celach pracy hipotezę i uzyskać niezwykle cenne i interesujące wyniki. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo duża ilość pracy włożona w uzyskanie samych materiałów do badań. Aspekt ten może nie zostać właściwie oceniony i doceniony przez osoby, które nie mają doświadczenia w ekspresji i oczyszczaniu białek, szczególnie pochodzenia fagowego. W moich oczach jednak doktorantka zdobyła uznanie sprawnie radząc sobie z tym zadaniem, szczególnie z kłopotliwym białkiem gp12.

Dobór literatury i materiałów źródłowych świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w temacie badań. W swojej pracy, mgr Paulina Miernikiewicz obficie czerpie głównie z najnowszych dokonań naukowych, ale również nie pomija starszych, często trudnych do zdobycia pozycji literaturowych. Cytowana literatura jest bardzo obszerna i zawiera 271 pozycji.

Recenzowana praca jest niezwykle starannie napisana. Błędy edytorskie są bardzo nieliczne, co nie zdarza się często w tego typu pracach. Przekradły się do tekstu nieliczne literówki i błędy edytorskie takie jak: "światło UVb" na stronie 33, „temperatura ciała poniżej 38°C lub poniżej 36°C” w opisie symptomów zespołu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, angielskie słówko „and” w zdaniu po polsku na stronie 37, błąd w nazwie gatunkowej bakterii „*Vibrio parashaemolyticus*” zamiast „*Vibrio parahaemolyticus*” na stronie 47, czy użycie angielskiego słowa „leptin” na stronie 140. Niemniej jednak, jak na tak obszerną pracę, zawiera ona niewielką ilość błędów, co jest albo wynikiem lekkiego pióra doktorantki, albo bardzo dokładnej i pracochłonnej korekty.

Przystępując do oceny uzyskanych rezultatów, muszę przyznać, że prace przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Porusza ona tematy, które są dla mnie niezwykle interesujące. Jednocześnie praca jest spójna i dobrze ustrukturyzowana, co znacznie ułatwia jej odbiór. Bardzo interesującą i jednocześnie niezwykle pracowitą częścią pracy było uzyskanie oczyszczonych białek fagowych. Konieczność zastosowania bardzo zróżnicowanego podejścia do ekspresji badanych białek i przewyciężenia problemów z ekspresją białka gp12 wskazują, na jakie problemy można się natknąć przy próbach produkcji białek fagowych. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują, jak można takie problemy przewyciężyć.

Moją uwagę przykuły wyniki, które jednoznacznie wskazują na to, iż białka kapsydu T4, jakimi są gp23*, gp24*, Hoc i Soc, nie wpływają na aktywność cytokin zapalnych, takich jak IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 p40/p70, IFN- γ , TNF- α , chemokin np. IL-8, MCP-1, MIG, RANTES, czynników wzrostu, np. MCSF, GCSF, GM-CSF, VEGF, mediatorów zapalenia związanych z alergią, np. IL-4, IL-5, IL-13, cytokin i czynników przeciwzapalnych, np. IL-10, sTNF RI, sTNF RII, lub cząstek adhezyjnych np. selektyny L, selektyny P, VCAM-1. Ponadto, nie wywołały one wybuchu tlenowego w ludzkich liniach komórkowych, nawet przy zastosowaniu wysokich stężeń badanych białek. Podobne wyniki uzyskano dla kompletnych, oczyszczonych wirionów faga T4 i bakteriofagów gronkowcowych A3R i 676Z, choć w przypadku wyników prezentowanych na rycinie 33 obserwuje się obniżenie produkcji niektórych mediatorów reakcji zapalnej w stosunku do wyników uzyskanych po podaniu LPS w ilości odpowiadającej zanieczyszczeniom preparatu fagowego. Czy doktorantka może odnieść się do tej uwagi? Ponadto prosiłbym o podanie, co było w tym przypadku wartością zerową? Czy był to poziom tych czynników w surowicy zwierząt kontrolnych, czy wykres przedstawia wartości bezwzględne?

W związku z tą częścią badań chciałem się zapytać, co było podstawą wyboru fagów A3R i 676Z do porównania z wynikami uzyskanymi dla bakteriofaga T4? Wydaje mi się, że słuszniejszym byłby wybór choć jednego faga atakującego bakterię *Escherichia coli* lub przynajmniej inną, blisko spokrewnioną bakterię Gram-ujemną. Porównanie wyników między fagami tak odległymi ewolucyjnie bakterii może w wielu przypadkach nie być łatwe a nawet możliwe. Dodatkowo bardziej zasadne wydaje mi się użycie fagów porównawczych aktywnych przeciw różnym gatunkom bakterii, a nie dwóch fagów porównawczych aktywnych przeciw jednej i to bardzo odległej ewolucyjnie bakterii.

Następna część pracy została poświęcona badaniu oddziaływania wybranych fagów z układem dopełniacza. W tej części mgr Paulina Miernikiewicz wykazała, że badane fagi wykazują zróżnicowany wpływ na aktywację układu dopełniacza. Bakteriofag T4 nie wpływał na aktywację dopełniacza we wszystkich trzech drogach: klasycznej, alternatywnej i lektynowej. Jednak jego mutant HAP1, który

jest pozbawiony białka Hoc, obniżał aktywność drogi klasycznej aktywacji dopełniacza. Jak doktorantka słusznie zauważyła, sugeruje to rolę tego białka w regulacji oddziaływania z układem dopełniacza. Zastosowane porównawcze fagi gronkowcowe powodowały obniżenie aktywacji dopełniacza w ramach ścieżki lektynowej. Doktorantka sugeruje, że może to być efekt zanieczyszczeń obecnych w preparatach fagowych. Tu nasuwa się pytanie, czy doktorantka miała możliwość użycia bakteriofagów oczyszczonych metodą ultrawiwrowania w gradiencie stężeń chlorku cezu? Preparaty takie charakteryzują się bardzo wysoką czystością, zwykle nieosiągalną w przypadku zastosowania chromatografii. Czy mgr Paulina Miernikiewicz określiła stopień zanieczyszczenia preparatów cząsteczkami innymi niż LPS? Na stronie 129 doktorantka pisze, że preparaty białkowe „zostały oczyszczone w wysokim stopniu z resztek zanieczyszczeń”, lecz nie podaje dokładnych wyników analiz, które były podstawą do wyciągnięcia takich wniosków.

W dalszej części zaprezentowano wyniki badań wpływu białka gp12 na rozwój stanu zapalnego indukowanego przy użyciu LPS. Białko to, po wyprodukowaniu i oczyszczeniu przez mgr Paulinę Miernikiewicz, zachowało swoją zdolność do wiązania LPS, a dzięki brakowi toksyczności zarówno w układzie hodowli komórkowej, jak i po bezpośrednim podaniu w modelu mysim, mogło zostać zastosowane jako potencjalny lek zmniejszający reakcję zapalną po podaniu LPS. Okazało się, że białko to spełniło pokładane w nim nadzieje i, być może w przyszłości, może zostać zastosowane jako lek wspierający leczenie w przebiegu sepsy.

Po zaprezentowaniu uzyskanych wyników zostały one przedyskutowane w ciekawej i dojrzałej dyskusji w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. W zasadzie większość zawartych w niej wniosków jest moim zdaniem słuszna, niemniej jednak osobiście nie odważyłbym się twierdzić, że bakteriofag T4 jest najlepiej poznanym wirusem bakteryjnym. Mógłbym wymienić co najmniej kilka fagów takich jak MS2, M13, Phi X 174 czy choćby λ , które zostały poznane, w moim subiektywnym odczuciu, w znacznie większym stopniu. Ponadto nie zgodzę się z twierdzeniem, że geny faga T4 i produkty białkowe tych genów zostały dokładnie scharakteryzowane. Zgodnie z moją wiedzą, nadal wiele genów faga T4 i produktów białkowych tych genów nie jest dokładnie scharakteryzowanych, a funkcja części z nich jest nadal nie znana.

W dyskusji znalazł się również skrót myślowy: „Rekombinowane białka otrzymywane w systemie ekspresyjnym *Escherichia coli* zawsze zawierają ogromną ilość bakteryjnego lipopolisacharydu i innych produktów bakteryjnych”. Z kontekstu wynika, że doktorantce chodziło nie o białka, lecz o preparaty białkowe.

Wymienione przeze mnie potknięcia nie wpływają znacząco na wartość pracy, która jest w moim odczuciu bardzo wysoka. Jej wyniki zostały opublikowane w trzech bardzo dobrych pracach – dwóch w czasopiśmie PLoS One i jednym w czasopiśmie Frontiers in Microbiology. W zasadzie taki dorobek publikacyjny kwalifikowałby się do przedstawienia pracy w formie zbitki tych artykułów opatrzonej odpowiednim komentarzem i dyskusją.

Wnioski końcowe

W oparciu o dokonaną analizę treści przedstawionej mi do recenzji pracy mgr Pauliny Miernikiewicz pt. "Ocena zdolności białek kapsydowych bakteriofaga T4 do modulowania reakcji zapalnej" na podstawie zawartych w niej wyników w odniesieniu do aktualnej wiedzy w temacie przedstawionych badań stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w zakresie nauk biologicznych. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Miernikiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w uznaniu dla wartości i aktualności zawartych w recenzowanej pracy wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o stosowne jej wyróżnienie.

 **UNIWERSYTET GDAŃSKI**
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
dr hab. Marcin Łoś
profesor nadzwyczajny