



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

PAN - Instytut Immunologii	
Wpl. dnia	1.7 -10- 2018
L. dz.	470 / 2018

Warszawa, 15. 10. 2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Kaźmierczak pt.: „**Identyfikacja adhezyjnych białek strukturalnych bakteriofagów T4, A3/R, 676/Z oraz ich wpływ na komórki ssaków**”

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

Ograniczona skuteczność antybiotykoterapii w walce z lekoopornymi szczepami bakterii narzuca konieczność poszukiwania środków antybakteryjnych alternatywnych dla antybiotyków. Należą do nich bakteriofagi - wirusy bakteryjne zdolne do zabijania swoich bakteryjnych gospodarzy, nawet tych, które nabyły oporność na antybiotyki. Środowiskiem namnażania bakteriofagów są komórki bakteryjne, środowiskiem ich przebywania komórki bakteryjne, ale też środowisko życia bakterii. Styczność bakteriofagów z elementami obu tych środowisk jest więc nieuchronna. Dotyczy to też bakteriofagów patogenów bakteryjnych, które zależnie od miejsc zasiedlanych przez ich gospodarzy mają styczność z określonymi organami lub komórkami ludzi lub zwierząt. Tymczasem zarówno oddziaływanie bakteriofagów z organizmami ludzi i zwierząt, w tym z ich układem immunologicznym, jak i konsekwencje tych oddziaływań dla bezpieczeństwa i skuteczności fagoterapii zakażeń bakteryjnych są bardzo słabo poznane. Systematyczne badania nad tym tematem zapoczątkowane zostały i prowadzone są dalej przez zespół prof. dr hab. Andrzeja Górskiego. Uczestniczą w nich również grupy kierowane przez wychowanków profesora, w tym grupa dr hab. Krystyny Dąbrowskiej, promotora rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Kaźmierczak.

Rozprawa doktorska mgr Kaźmierczak ściśle wpisuje się w tą tematykę i dotyczy oddziaływań bakteriofagów o potencjale terapeutycznym z komórkami ssaków, a w szczególności identyfikacji niektórych białek zaangażowanych w te oddziaływania. Doktorantka wyznaczyła sobie jako główny cel identyfikacja tych białek strukturalnych wybranych bakteriofagów gronkowcowych: A3/R i 676/Z, które nadają fagom zdolność do oddziaływań z komórkami ludzkimi. Cel ten udało jej się zrealizować - w wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowała białko fagowe o pożądanych właściwościach.

Praca została wykonana w Laboratorium Bakteriofagowym Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, które przez wiele lat badań nad terapią fagową zgromadziło bogatą kolekcję bakteriofagów do zastosowań terapeutycznych. Jako obiekt badań opisanych w pracy wybrano modelowego bakteriofaga T4 *Escherichia coli* (którego białko Hoc dokorujące kapsyd zostało wcześniej zidentyfikowane przez dr hab. Krystynę Dąbrowską jako odpowiedzialne za oddziaływanie tego faga z organizmami ssaków), oraz bakteriofagi A3R i 676Ż *Staphylococcus aureus* wykorzystywane w fagoterapii zakażeń tą bakterią. Motywacja takiego wyboru jest zrozumiała, ze względu na wykazaną w wielu przypadkach skuteczność terapeutyczną wybranych fagów oraz szeroki zakres szczepów w obrębie gatunku *Staphylococcus aureus* infekowanych przez fagi A3/R i 676/Z.

Wyniki opisane w pracy można podzielić na dwie części. Pierwsza dotyczy opracowania metody badania cyrkulacji bakteriofaga T4 w organizmie myszy oraz obrazowania w komórkach eukariotycznych *in vitro*, a także w tkankach myszy *in vivo*, faga T4 eksponującego fluorescencyjne białko Gfp na kapsydzie. Chociaż technika znakowania bakteriofaga T4 poprzez inkorporację do kapsydu faga frakcji białek tworzących kapsyd w fuzji z białkiem Gfp nie jest nowa, w pracy pokazano przydatność wyznakowanych w ten sposób bakteriofagów do monitorowania kumulacji bakteriofaga T4 w komórkach i w tkankach ssaczy. Wykazano, że fagi wyznakowane Gfp i podane dożylnie myszy kumulują się w śledzionie i elementach układu fagocytarnego (siateczkowo-śródbłonkowego), co może potencjalnie prowadzić do indukcji specyficznej odpowiedzi układu immunologicznego na te fagi.

Wątek związany z indukcją odpowiedzi immunologicznej u ssaków, w tym człowieka, przez bakteriofagi kontynuowany był przez autorkę jako jeden z wątków drugiej części wyników pracy, która dotyczy bakteriofagów gronkowcowych A3/R i 676/Z. Autorka wykazała, że u myszy oba fagi indukują produkcję przeciwciał zarówno klasy IgM jak i IgG. W tej części doktorantka podjęła się też identyfikacji białek strukturalnych badanych fagów mogących potencjalnie oddziaływać z komórkami ssaków, określenia lokalizacji tych białek w wirionach, zbadania ich interakcji z

surowicami zdrowych ochotników wykazującymi reaktywność wobec bakteriofagów A3/R i 676/Z, zbadania zdolności przeciwciał przeciwko tym białkom do blokowania aktywności przeciwbakteryjnej fagów oraz zbadania zdolności badanych białek do adhezji do wybranych komórek ssaczy. Na podstawie wyników analizy bioinformatycznej wszystkich białek obu fagów podstawowymi nadrzędnymi do analiz porównawczych, do badań wytypowano 5 białek, oznaczonych w pracy jako A2, A3, A4, A6 i A8. Cztery z nich w przypadku obu fagów mają identyczne sekwencje aminokwasowe, sekwencja jednego (A6) różni się o 4% w przypadku wariantów kodowanych przez A3/R i 676/Z. Kryteria wyboru są niejasno opisane w pracy. Nie podano jakie konkretne cechy każdego z tych białek decydowały o jego wyborze, poza ogólnym stwierdzeniem, że poszukiwano białek o konserwatywnych domenach sugerujących aktywność względem komórek eukariotycznych, białek podobnych do innych białek strukturalnych fagów, czy też białek podobnych do białek eukariotycznych. Prosiłabym o uzupełnienie brakujących informacji.

Geny wszystkich wytypowanych do analizy białek sklonowano w wektorach ekspresyjnych w fuzji z genem kodującym transferazę S-glutationową (GST), w celu oczyszczenia metodą chromatografii powinowactwa. Zoptymalizowano warunki nadprodukcji wszystkich białek w komórkach *E. coli*, poprzez dobór odpowiednich szczepów bakterii oraz dobór warunków nadprodukcji. Dodatkowo, dla zwiększenia frakcji każdego z białek w postaci prawidłowo sfałdowanej wykorzystano do ekspresji komórki z plazmidami kodującymi białka opiekuńcze i produkującymi zwiększone ilości tych białek. Białka odzyskiwano ze złoża wykazującego powinowactwo do GST poprzez odtrawianie proteazą AcTEV rozpoznającą sekwencję łącznika pomiędzy GST, a każdym z badanych białek w fuzjach GST z tymi białkami. Każde z uwolnionych w ten sposób białek poddano dodatkowo wieloetapowej procedurze dalszego oczyszczania w celu usunięcia endotoksyn i zanieczyszczeń innymi białkami. Analiza chromatograficzna wykazała wysoką czystość otrzymanych preparatów białkowych, a otrzymane ilości tych białek wystarczyły do immunizacji zwierząt oraz do dalszych badań. Wykazano, że przeciwciała przeciwko wszystkim badanym białkom, z wyjątkiem A3 reagują z wirionami fagów A3/R i 676/Z.

Przeciwciała przeciwko poszczególnym białkom wykorzystano do immunodetekcji tych białek w wirionach fagów A3/R i 676/Z. Do monitorowania lokalizacji przeciwciał pierwszorzędowych związanych z poszczególnymi białkami wirionów wykorzystano przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z cząsteczkami złota. Dzięki temu wykazano, że białko A2 w przypadku obu fagów eksponowane jest na powierzchni kapsydu, białka A4 i A6 eksponowane są na rurkowatej części ogonka, a białko A8 zlokalizowane jest w obrębie płytki podstawnej. Badając

wpływ otrzymanych przeciwciał przeciwko badanym białkom na aktywność antybakteryjną fagów A3/R i 676/Z autorka wykazała, że tylko przeciwciała przeciwko białku A8, zlokalizowanemu w płytce podstawnej blokują aktywność przeciwbakteryjną obu fagów.

Interesujących wyników dostarczyły badania zdolności surowic 55 ochotników nigdy nie leczonych fagami do reakcji z fagami A3/R i 676/Z. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono reaktywność z fagami około 30-35% badanych surowic. Jednak w żadnej z badanych surowic nie wykryto przeciwciał klasy IgG zdolnych do reakcji z białkami A2, A6 i A8, co wskazuje na brak immunogenności tych białek. W badaniach tych nie umieszczono wyników podobnych badań dla białka A4, co wymagałoby wyjaśnienia.

W dalszym etapie pracy autorka zbadła zdolność adhezji wszystkich pięciu badanych białek do komórek eukariotycznych wybranych linii, kierując się przy wyborze pochodzeniem komórek z miejsc typowo zasiedlanych lub infekowanych przez gronkowca złocistego. Tylko wyniki dla białka A6 różniły się znacząco statystycznie od wyników dla kontroli negatywnej, co pozwoliło autorce na wywnioskowanie, że białko A6 tworzące część powierzchni kapsydu, może uczestniczyć w adhezji wirionów fagów A3/R i 676/Z do określonych komórek eukariotycznych. Jednak o wartości przedstawionych wyników decyduje nie tylko sam fakt identyfikacji pożądanego białka, co będzie wymagało dalszych badań, ale też sama strategia jego identyfikacji, możliwa w przyszłości do zastosowania w celu identyfikacji innych białek fagowych o podobnych właściwościach.

Z opisu metod i wyników wyłania się ogrom pracy włożony przez autorkę w przygotowanie przedstawionej do oceny rozprawy. Doceniam sukces w opracowaniu wydajnych metod nadprodukcji i pozyskania w rozpuszczalnej formie pięciu białek strukturalnych fagów A3/R i 676/Z. Każdy, kto klonował geny kodujące białka wirionów w celu pozyskania ich produktów, zdaje sobie sprawę, że w wielu przypadkach nie jest to zadanie trywialne z uwagi na kłopoty z ekspresją określonych genów lub agregacją kodowanych przez nie białek w nieobecności innych białek danego faga. Mam więc pytanie, czy były też białka, które autorka wybrała do badań, ale nie opisała ich w pracy z uwagi na problemy z nadprodukcją.

Na uwagę w pracy zasługują zdjęcia z mikroskopu elektronowego wskazujące na wspomnianą lokalizację wymienionych białek. Nie zgadzę się natomiast z twierdzeniem autorki pracy, że białka A4 i A6 zlokalizowane są na tubie ogonka. U fagów A3/R i 676/Z tuba otoczona jest kurczliwą pochewką. Widoczne na zdjęciach bakteriofagi z przyczepionymi do nich przeciwciałami przeciwko tym białkom mają wydłużone pochewki i przeciwciała wyraźnie

przylegają do powierzchni pochewek. By mogły przylegać do powierzchni tuby pochewki musiałyby być skurczone, żeby odsłonić tę powierzchnię.

Na niektórych zdjęciach obrazujących lokalizację białek A2, A4 i A6 w wirionie odległość punktów reprezentujących cząsteczki złota, skoniugowane z przeciwciałami drugorzędowymi, od powierzchni tuby ogonka wirionu lub kapsydu jest dość duża. Co więcej, na niektórych z tych zdjęć widać tylko pojedyncze cząsteczki złota w sąsiedztwie wirionu. Prosiłabym autorkę o skomentowanie tych obserwacji. Czy można to tłumaczyć wielkością kompleksu pierwszorzędowych i drugorzędowych przeciwciał?

Wyniki części pracy dotyczącej wizualizacji faga T4 zostały opublikowane w 2014 roku w recenzowanym czasopiśmie *Bacteriophage* w pracy pt. "Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells", której pierwszym autorem jest mgr Kaźmierczak. Warto podkreślić, że wspomniany artykuł, mimo, że nie został on opublikowany w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR), doczekał się sześciu cytowań w czasopismach bazy PubMed Central, co świadczy o dostrzeżeniu cytowanej pracy przez środowisko naukowe. Inną część pracy podsumowano w formie opisu metody w rozdziale do książki wydawnictwa Springer *Methods in Molecular Biology*. Ponadto różne części pozostałych wyników pracy zostały zaprezentowane w formie komunikatów konferencyjnych podczas 12 międzynarodowych konferencji poświęconych bakteriofagom, ich biologii lub zastosowaniom. Uważam, że nieopublikowana jeszcze część wyników również będzie mogła zostać wykorzystana jako materiał źródłowy do publikacji.

Rozprawa liczy 161 stron tekstu, uzupełnionego 32 rycinami i 18 tabelami. Jest napisana zwięźle, ale zrozumiale i czyta się ją lekko, a podrozdziały, szczególnie w rozdziale Wyniki, są uporządkowane w logicznej kolejności. Zawarty na 28 stronach wstęp zawiera krótkie wprowadzenie do problemu antybiooporności bakterii chorobotwórczych, krótką charakterystykę bakterii, których bakteriofagi badano w pracy oraz chorób przez nie powodowanych, wprowadzenie do zagadnień związanych z fagoterapią. Najobszerniejszą jego część autorka poświęciła cyrkulacji bakteriofagów w organizmach ssaków oraz poznany dotąd oddziaływanion pomiędzy bakteriofagami i organizmami ssaków lub też ich konkretnymi komórkami. Omówiła też krótko wyniki badań dotyczących odpowiedzi immunologicznej na fagi. Opis Materiałów i Metod zawarty jest na 34 stronach pracy. Wachlarz zastosowanych w pracy metod jest imponujący, począwszy od podstawowych metod mikrobiologicznych, poprzez metody klonowania, nadprodukcji i oczyszczania białek, a skończywszy na metodach immunomikroskopii elektronowej i innych metodach immunologicznych, a także technikach hodowli tkankowych i badań na myszach. Opis omówionych już wcześniej wyników zawarty jest na 32 stronach tekstu i

stanowi mocną stronę pracy. Można mieć pewne zastrzeżenia do nadużywania w pracy żargonu laboratoryjnego, angielskich słów i skrótów myślowych w niektórych podrozdziałach (patrz: media to po polsku pożywki; bakterii nie transformuje się szokiem termicznym, a DNA; sformułowania typu "Reakcj BP" , czy "Reakcja LR" jako tytuły podrozdziałów są za mało informatywne i powinny być zastąpione bardziej informatywnymi sformułowaniami). Ponadto autorka dodaje przy podtytułach wielu podrozdziałów zawartą w nawiasie informację "Wg procedury ustalonej w Samodzielnym Laboratorium Bakteriofagowym IIiTD PAN". W niektórych przypadkach informacja ta jest zasadna. Natomiast w przypadku np. opisu znanej od lat standardowej procedury oznaczania miana fagów metodą testu nakropieniowego nazwanej w pracy metodą testu standardowych rozcieńczeń, czy też oznaczania białka metodą Lowry'ego, jest nieuzasadniona. Gen *ccdB* nie koduje barnazy, jak podano w opisie plazmidów pDEST, a toksynę systemu toksyna-antytoksyna plazmidu F, która blokuje pełną aktywność gyrazy DNA prowadząc do fragmentacji DNA w komórkach. Niektóre opisy materiałów zyskałyby na większej szczegółowości. Np. przy opisie plazmidów dobrze byłoby nadmienić do czego konkretnie każdy z tych plazmidów był w pracy wykorzystywany.

Najslabszą częścią pracy jest zaledwie pięciostronnicowa dyskusja, która w dużej części zawiera podsumowanie wyników. Zagadnienia szeroko i ciekawie omówione w powiązaniu z wynikami prezentowanej pracy dotyczą głównie przykładów translokacji bakteriofagów w organizmach ludzi lub zwierząt, doniesień o indukcji produkcji przeciwciał przez bakteriofagi oraz o braku dowodów na powiązania między indukcją przeciwciał, a efektywnością fagoterapii. W dyskusji pominięto próby przedyskutowania funkcji badanych białek fagów A3/R i 676/Z w kontekście dostępnych danych literaturowych. Prosiłabym o uzupełnienie tych informacji. Nie jest też prawdą, że to w przedstawionej do oceny pracy wykazano, że białka oznaczone w tej pracy jako A2, A4, A6 i A8, są białkami strukturalnymi wirionu. Białka te, oznaczone odpowiednio jako Mcp (major capsid protein), TmpH (tail morphogenetic protein H), ORF059 i ORF096 w plikach z anotacjami sekwencji faga A3/R i 676/Z oraz fagów blisko spokrewnionych zdeponowanymi w bazie danych GenBank oraz w publikacji na temat genomów tych fagów były już wcześniej zidentyfikowane jako białka strukturalne wirionu na podstawie wyników analiz proteomicznych blisko spokrewnionych fagów rodzaju *Kayvirus* (>93% identyczności genomów; patrz: Łobocka i in. 2012, *Advances in Virus Research*). Nowością w przedstawionej do oceny pracy jest natomiast pokazanie lokalizacji wymienionych białek w wirionie oraz zdolności białka A6 do adhezji do wybranych komórek eukariotycznych. Nie jest dla mnie natomiast zrozumiałe, dlaczego dla białek, które już wcześniej były nazwane, w pracy zastosowano nowe nazwy.

W toku pracy dokonano ciekawej obserwacji wskazującej na różnice pomiędzy wrażliwością fagów A3/R i 676/Z na neutralizującą aktywność niektórych surowic pobranych od ochotników. Wiadomo, że różnice pomiędzy fagami A3/R i 676/Z są niewielkie, ale są to nie tylko niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej określonych białek, ale też w liczbie kodowanych białek - genom faga A3/R zawiera mniej genów kodujących białka. Czy na podstawie informacji o różnicach pomiędzy reaktywnością obu fagów z surowicami oraz ich potencjałem kodującym można możnaby spekulować, które z różnic między fagami mogłyby być odpowiedzialne za różnice w reakcji z surowicami.

W mojej opinii przedstawiona mi do oceny praca jest istotnym wkładem do naszej wiedzy na temat oddziaływań bakteriofagów z organizmami eukariotycznymi oraz na temat białek biorących potencjalnie udział w tych oddziaływaniach. Moje uwagi krytyczne nie pomniejszają w istotny sposób zasadniczych wartości merytorycznych ocenianej pracy. Dlatego 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. Stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Zuzanny Kaźmierczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Zdobych