



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	17-10-2018
L. dz.	473/2018

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, 2018-10-11

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Kaźmierczak

pt. „Identyfikacja adhezyjnych białek strukturalnych bakteriofagów T4, A3/R, 676/Z oraz ich wpływ na komórki ssaków.”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Zuzanna Kaźmierczak, 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 wybranym bakteriofagom terapeutycznym *Staphylococcus aureus* A3/R, 676/Z oraz białkom strukturalnym tych fagów. Badano immunogenność, lokalizację białek strukturalnych w wirionie fagowym, neutralizację przez specyficzne przeciwciała i oddziaływanie z komórkami ssaków. Badania przedstawione w pracy były realizowane częściowo w ramach projektu: Grant NCN Sonata bis UMO-2012/05/E/NZ6/03314 „Identyfikacja wpływu bakteriofagów o potencjale terapeutycznym na funkcje komórkowe oraz układ immunologiczny ssaków”. Część wyników zostało opublikowanych w dwóch pracach: Kaźmierczak i wsp. (2014) Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. Bacteriophage. 4: e28364 oraz Kaźmierczak i Dąbrowska (2018) Interaction of Bacteriophages with Mammalian Cells. Methods Mol Biol. 1693: 113-122.

Staphylococcus aureus jest patogenem wywołującym liczne jednostki chorobowe, w tym ciężkie i przetrwałe infekcje zarówno u ludzi jak i zwierząt. Bakteria ta zaliczana jest to antybiotykoopornej grupy ESKAPE. Badania dotyczące immunogenności fagów oraz oddziaływań z komórkami układu immunologicznego i tkanek człowieka są ważne dla rozwoju terapii fagowej, jako alternatywy dla często nieskutecznych antybiotyków. Doktorantka w swojej pracy skupiła się na dwóch terapeutycznych fagach A3/R, 676/Z specyficznych wobec *Staphylococcus*, stosowanych w preparatach leczniczych Ośrodka Terapii Fagowej IITD we Wrocławiu. Choć fagoterapia jest już coraz częściej stosowana, istnieje niewiele doniesień literaturowych opisujących charakterystyczne cechy białek strukturalnych wirionów fagowych w odniesieniu do dystrybucji fagów w organizmie człowieka w trakcie terapii, czy w obrębie mikrobiomu.

Omawiając **wstęp pracy** doktorskiej, stwierdzam, że solidnie została przygotowana część opisująca fagi gronkowcowe oraz sam patogen na tle aktualnych doniesień o lekooporności *S. aureus*, w tym przynależności do grupy ESKAPE. Natomiast zbędny wydaje się podrozdział 1.2.1 poświęcony *E. coli*, która *de facto* nie była obiektem badań w tym projekcie, a jedynie wykorzystano faga T4 jako modelowego przedstawiciela *Myoviridae*. Dużo też zrzęcniej byłoby przenieść rozdział omawiający faga T4 na koniec wstępu fagowego w celu nie zaburzania ciągu opowieści o gronkowcach, w tym ich oporności na antybiotyki, możliwościach terapii alternatywnych w postaci fagów i aktualnym stanie wiedzy na temat fagów przeciwgronkowcowych. W opisie samych fagów A3/R i 676/Z nie zgadza się przyporządkowanie taksonomiczne do Tvert-like wirusów, ponieważ aktualnie na stronie *NCBI taxonomy database* ma się to następująco: oba fagi są przyporządkowane do *Myoviridae*; *Spounavirinae*; *Kayvirus*; *Staphylococcus virus G1*. Rozumiem, że doktorantka posiłkowała się danymi z literatury Łobocka i wsp. z 2012, a obecnie prowadzone porządkowanie taksonomiczne stworzyło nową grupę *Staphylococcus virus G1*.

Drobne uwagi do wstępu:

- o określenie „pośrednio na wankomycynę” powinno być zastąpione „średnio wrażliwe na wankomycynę”

- Tabela 1.2 lub najważniejsze informacje taksonomiczne oraz numery dostępu w bazie GenBank powinny się znaleźć w sekcji Materiały i Metody w punkcie opisującym wybrane fagi przeciwgronkowcowe użyte w badaniach.
- Tabela 1.3 brakuje jednostki miary dla masy cząsteczkowej przeciwciał
- Ryc. 1.3 pokazuje nam organizację genomu fagów *Siphoviridae*, zamiast fagów *Myoviridae*, które są celem badań.

Cel pracy doktorskiej Pani Zuzanny Kaźmierczak został sformułowany jako: „...identyfikacja tych białek strukturalnych wybranych bakteriofagów gronkowcowych: A3/R i 676/Z, które nadają fagom zdolność do oddziaływań z komórkami ludzkimi.”

I tu mam pierwsze pytanie, bo widzę rozbieżność między głównym tytułem pracy, a tym co zostało ujęte w rozdziale „Cel pracy”. Tytuł pracy brzmi „Identyfikacja adhezyjnych białek strukturalnych bakteriofagów T4, A3/R, 676/Z oraz ich wpływ na komórki ssaków” natomiast w celu pracy wymienione są tylko fagi przeciwgronkowcowe jako obiekt badań. Co więcej określenie „identyfikacja białek adhezyjnych” 3 fagów w tytule nie odpowiada zawartości celu pracy oraz wynikom omawianych w kolejnych rozdziałach.

Omówienie rozdziału Materiały i Metody:

Rozdział ten zamieszczony jest na 34 stronach i zawiera faktycznie 41 szczegółowo opisanych metod z zakresu biologii molekularnej, immunologii, badan *in vivo* oraz zagadnień etycznych. Przy tej ilości różnorodnych technik i materiałów Doktorantce umknęło umieszczenie punktu opisującego charakterystykę linii komórkowych zastosowanych w doświadczeniach z adhezją. Zostały wpisane jedynie media zastosowane do ich hodowli. Dla niewprawnego w badaniach na modelu mysim czytelnika pomocne byłoby też opisanie czym charakteryzowały się myszy C57BL6/J i dlaczego takie zostały wybrane do badań. W części molekularnej zabrakło też informacji czy i gdzie było wykonywane sekwencjonowanie produktów PCR, czy *orientation* PCR dla klonowanych fragmentów DNA. Dobrze byłoby też opisać dlaczego dane procedury są wykonywane. Na przykład: dlaczego stosowano surowice inaktywowane i nie, w metodzie 4.30? Co konkretnie ulegało wybarwieniu sulfrodaminą w metodzie 4.38, i jak wyniki tej metody należy interpretować? Przydałoby się parę zdań wyjaśniających do

zasadności i założeń zastosowanych metod, czyli po co? w jakim celu? które metody są zablokowane, czyli służą do realizacji konkretnego celu w projekcie? Przy takim opisie metodologii Doktorantka byłaby w stanie stworzyć logiczny ciąg zadań do wykonania i zwrócić uwagę na elementy zbędne w projekcie, które zapewne były warte wykonania, ale nie pasują do prezentowanej pracy. Jednym z przykładów jest analiza bioinformatyczna (4.46) do określenia obecności genów kodujących toksyny w genomach fagowych. W jakim celu to zostało zrobione?

Idąc tym tropem część elementów pracy, które znalazły się w Wynikach, lepiej pasowałyby do sekcji Materiały i Metody, w tym opis i Ryc. 5.1 dotyczące zakresów wzbudzania i emisji białka GFP.

Omówienie rozdziału Wyniki:

W realizacji projektu Doktorantka wykonała kilka zadań:

1. Przygotowano znakowanego białkiem GFP faga T4 i określono jego akumulację w komórkach i narządach na modelu mysim.
2. Przygotowano pięć rekombinowanych białek strukturalnych A2, A3, A4, A6, A8 oraz oczyszczone hodowle badanych fagów A3/R, 676/Z
3. Wykonano lokalizację strukturalną wybranych białek za pomocą immunomikroskopii elektronowej
4. Określono wpływ przeciwciał specyficznych wobec białek bakteriofagowych A2, A3, A4, A6, A8 na przeciwbakteryjną aktywność fagów A3/R i 676/Z
5. Porównano zdolność bakteriofagów A3/R oraz 676/Z do indukcji specyficznych przeciwciał klasy IgM oraz IgG w modelu mysim,
6. Oznaczono częstość występowania przeciwciał neutralizujących bakteriofagi A3/R i 676/Z oraz poziom naturalnych przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym białkom strukturalnym tych fagów u osób zdrowych
7. Badano adhezję wybranych białek bakteriofagów terapeutycznych A3/R i 676/Z do komórek eukariotycznych

Pierwsza część wyników poświęcona jest przygotowaniu znakowanego białkiem GFP faga T4, w celu oceny przydatności znakowanych fagów do detekcji i obrazowania kumulacji fagów w komórkach ssaczych oraz na modelu mysim *in vivo*. Zastosowano metodologię z mutantem HAP1 faga T4 namnażanym w szczepie ekspresyjnym zawierającym plazmid z genem białka Hoc sprzężonym z genem

białka GFP. Jest to bardzo ciekawe podejście metodyczne, które jak Doktorantka wykazała, okazało się również efektywne w obrazowaniu zarówno komórkowym jak i całych narządów pobranych z myszy traktowanych preparatami fagowymi.

Drobne uwagi to tej części wyników:

- Ryc. 5.3 i 5.4. Zdjęcie żelu przedstawia produkt PCR genu *gfp* i *hoc* a w tytule czytamy: „Czerwoną strzałką oznaczono plazmidowe zawierające poprawnie wprowadzony gen i wykorzystane w dalszych etapach pracy”
- Ryc. 5.8 zbyt małe czcionki na wykresie uniemożliwiają odczytanie wartości i opisu osi
- Ryc. 5.11 brak opisu A,B,C,D,E,F na poszczególnych zdjęciach oraz brak opisu skali zamieszczonej obok

Kolejna część wyników i większość doświadczeń dotyczyła immunogenności badanych fagów *Staphylococcus* oraz wybranych białek strukturalnych. Zbadano 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 w wirionie faga.

Chciałam zadać kilka pytań dotyczących tej części wyników. Nie zrozumiałam stwierdzenia i założenia analiz *in silico* opisanych jako: „W niniejszej pracy przeprowadzono dodatkową analizę potencjalnych białek strukturalnych, w kierunku ich oddziaływań adhezyjnych oraz ewentualnego podobieństwa do aktywnych produktów białkowych występujących u organizmów eukariotycznych.”

I dalej: „Białka do dalszej analizy wytypowano w oparciu o:

- a) występowanie konserwatywnych domen oraz ich funkcję sugerującą potencjalną aktywność względem komórek eukariotycznych
- b) podobieństwa do innych białek występujących u organizmów prokariotycznych – szczególnie zwracano uwagę na podobieństwo do innych białek strukturalnych bakteriofagów (aktualizacja danych)
- c) podobieństwo do białek eukariotycznych”

Punkty (b) jest zasadny i zrozumiały kiedy poszukujemy homologicznych białek strukturalnych faga. Bardzo proszę o wyjaśnienie założeń (a) i (c), czyli dlaczego i na jakiej zasadzie wyszukiwano podobieństwa do organizmów eukariotycznych oraz jakie uzyskano wyniki?

Ostatecznie do dalszych badań wybrano 5 białek strukturalnych zamieszczonych w tabeli 5.1.

Ponieważ brakuje tu opisu ciągu myślowego jakim kierowała się doktorantka nasuwa się od razu pytanie: Czy analizując genomy obu fagów anotacja wykazała obecność tylko 5 białek budujących wirion tych fagów? A jeśli więcej to dlaczego akurat te 5 zostało włączonych do doświadczeń?

Bardzo ciekawy etap badań dotyczył lokalizacji wybranych białek strukturalnych w obrębie wirionu badanych fagów. Doktorantka wykorzystała szereg metod, w tym biologii molekularnej, immunomikroskopii elektronowej, analiz ELISA, generowanie przeciwciał na modelu mysim, w celu wykonania znakowania białek na fagach. W sumie Pani Zuzanna włożyła bardzo wiele pracy w uzyskanie wyników, każda metoda jest opisana szczegółowo co do przygotowania i wykonania, ale znowu zabrakło wstępu wprowadzającego czytelnika w zasadność procedur i celu wykonania poszczególnych etapów, a co najważniejsze szczegółowego podsumowania końcowych rezultatów i konsekwencji z nich płynących co do lokalizacji, immunogenności, infekcyjności faga, skuteczności blokowania aktywności fagów przez specyficzne surowice (w tym inaktywowane termicznie) i ewentualnych oddziaływań z komórkami organizmów wyższych.

Drobne uwagi to tej części wyników:

- Brak opisu, który genom jest porównywany do którego na Ryc. 5.12
- Brak opisu wyników płynących z Ryc 5.12, w jakim *locus* znaleziono różnice pomiędzy genomami fagów gronkowca, jakich genów dotyczy widoczny region ok. 130 000 bp.
- Co oznacza stwierdzenie: „częściowe sekwencjonowanie”, „obecność genów w prawidłowym układzie w obszarze polilinkera wektora pDONR221”, czy „bezpośrednie sekwencjonowanie”
- Czy produkty PCR w analizach elektroforetycznych, które nie były oznaczone strzałkami, ale miały ta sama masę były próbkami nieprawidłowymi?
- Tekst ze strony 104 powinien być umieszczony w rozdziale Materiały i Metody
- Tabela 5.8, 5.16 powinny być skumulowane na 1 stronie A4

- Tytuł podrozdziału 5.2.5 C brzmi „Charakterystyka strukturalna bakteriofagów A3/R, 676/Z za pomocą immunomikroskopii elektronowej”. Wpisałamby raczej lokalizacja wybranych białek strukturalnych fagów A3/R, 676/Z za pomocą immunomikroskopii elektronowej.
- Ryc. 5.16 co oznacza opis osi Y: OD by ELISA?
- Brak odnośnika w tekście do Ryc 5.17
- Ryc. 5.21 brak opisu osi X i Y
- Dlaczego w doświadczeniu opisanym w punkcie 5.2.9 badano tylko 3 białka A2, A6, A8, a nie włączono A4?

Ostania część wyników poświęcona jest badaniu adhezji wybranych białek bakteriofagów terapeutycznych A3/R i 676/Z do komórek eukariotycznych. We wstępnych zdaniach czytamy, że „Ze względu na stałą obecność bakteriofagów w organizmach ssaków postuluje się, że bakteriofagi wykształciły specjalne mechanizmy pomagające im utrzymać się w tym środowisku (Górski i wsp. 2003, Dąbrowska i wsp. 2014). Kapsydy fagów są zbudowane z różnych białek, a ich układ w kapsydzie jest uporządkowany, co wzmacnia ekspozycję i ewentualne oddziaływania przestrzenne.” Bardzo ciekawe spostrzeżenie i godny przebadania pomysł, czy faktycznie fagi gronkowcowe wykształciły na drodze ewolucji specyficzne białka strukturalne umożliwiające oddziaływanie z komórkami tkanek kolonizowanych przez ich gospodarzy, czyli gronkowce. Do badania wybrano ludzkie komórki gardła FaDu (epithelium, komórki nowotworowe), ludzkie komórki naczyń krwionośnych płuc HLMEC (endothelium, komórki prawidłowe), ludzkie komórki skóry Hs 294T (komórki nowotworowe), oraz komórki kontrolne: mysie fibroblasty BALB/3T3 (komórki prawidłowe). Szkoda, że nie włączono do badań na przykład linii ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™)), gdzie teoretycznie prawdopodobieństwo lokalizacji gronkowców jest dużo większe niż w komórkach naczyń krwionośnych płuc. Nie widzę też wyników dla białka A2 w badaniu oddziaływań z komórkami skóry. Należy podkreślić, że w celu wykonania badań adhezji opracowano aktorską metodologię umożliwiającą powyższe eksperymenty. Jednak Doktorantka nie uwypukliła tego punktu, a rezultaty długich doświadczeń opisała tylko w 2 zdaniach, bez rozwinięcia wniosków i wyjaśnienia konsekwencji lub ustosunkowania się do założeń wcześniej podanych.

Podsumowanie części wynikowej:

W pracy wykorzystano szereg metod z zakresu biologii molekularnej (produkcja białek rekombinowanych, przygotowanie znakowanych białkiem GFP fagów), 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, ale także godnym uznania przygotowaniem praktycznym Doktorantki. Pragnę również podkreślić, że jestem pod wrażeniem ogromu pracy jaka została wykonana w dwóch najważniejszych i najbardziej pracochłonnych etapach doktoratu, tzn. przy opracowaniu i przygotowaniu faga T4 znakowanego białkiem GFP i późniejszych eksperymentach kumulacji w komórkach i narządach, oraz przy przygotowaniu i optymalizacji ekspresji białek strukturalnych i w badaniach *in vivo*, które wymagały tytanicznej pracy i precyzyjnej organizacji działania przy kolekcjonowaniu i analizie próbek pochodzących z kilkudziesięciu punktów czasowych od momentu podania preparatu myszom aż do 6 miesięcy po zaszczepieniu.

Omówienie dyskusji i wniosków

Dyskusja zamieszczona została na 5 stronach tekstu a wnioski wymienione w 7 punktach, które są raczej streszczeniem wyników a nie wnioskami.

Ponieważ mam duży niedosyt w kwestii opisowej doktoratu, przedstawienia ciągłości logicznej projektu i podsumowania jakie były założenia i jakie finalnie możemy wyciągnąć wnioski z tego ogromu pracy jaki wykonała Doktorantka, to mam nadzieję, że w trakcie obrony publicznej oraz przy przygotowywaniu prezentacji, takie wyjaśnienia i podsumowanie zostaną przedstawione.

Co do formalnej strony dysertacji, Pani mgr Zuzanna Kaźmierczak, zastosowała układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 161 stron, w tym 32 ryciny, 18 tabel oraz 241 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, choć Doktorantka nie uniknęła żargonu naukowego i zapożyczeń językowych.

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. Przeprowadzone badania dowodzą dużych umiejętności Doktorantki w poprawnym posługiwaniu się nowoczesnymi metodami badawczymi. Miałam natomiast szereg uwag do formy prezentacji metod czy wyników, braku opisowej części doświadczeń pozwalających czytelnikowi na zrozumienie ciągłości i celowości wydarzeń. Natomiast zdaje sobie sprawę, że są naukowcy rewelacyjni w tak zwanym labie, którzy wykonują tytaniczną pracę, uzyskują rewelacyjne wyniki, natomiast brak im umiejętności literackich, czy edytorskich i dlatego do wyrażenia swoich myśli posługują się pojedynczymi stwierdzeniami, i to najlepiej jakby były ułożone w punktach.

Podsumowanie.

Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą. Rozprawa została napisana przejrzysto pod względem językowym. Zauważone błędy i moja krytyka strony edytorskiej (być może polemiczna) nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Pani mgr Zuzanna Kaźmierczak wykazała się 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 Zuzanna Kaźmierczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada 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.).

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa

