

wpi. 14.05.2012  
7

14 MAJ 2012



**UNIwersytet Warszawski  
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-304, FAX: (+22) 55-41-304

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR BOŻENY NEJMAN-FALEŃCZYK**

**„Kontrola replikacji fagów lambdoidalnych niosących geny toksyn Shiga w świetle potencjalnych nowych metod ich wykrywania i terapii zakażeń enterokrwotocznymi szczepami *Escherichia coli*”**

Rozprawa doktorska Pani Bożeny Nejman-Faleńczyk została wykonana w ramach studiów doktoranckich w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pana Profesora Grzegorza Węgrzyna. Praca mocno wpisuje się w nurt badań realizowanych w Katedrze związanych od lat mocno z biologią wirusów bakteryjnych. Oceniana rozprawa posiada duży potencjał zastosowań praktycznych, co czyni ją bardzo istotną z punktu widzenia biotechnologii. Zasadniczym celem przedstawionej rozprawy było poznanie mechanizmu regulacji replikacji DNA bakteriofagów niosących geny *stx* i wskazanie na możliwości aplikacyjne uzyskanej konstrukcji. Temat pracy doktorskiej jest aktualny i ważny, ponieważ związany jest mocno z ubiegłoroczną epidemią w Europie, spowodowaną przez bakterie *Escherichia coli* STEC, podczas której odnotowano 4075 zachorowań, w wyniku czego zmarło 50 osób. Niestety, jeszcze niewiele wiadomo o rozwoju bakteriofagów niosących geny toksyn Shiga. Podstawą dla zrozumienia biologii tych fagów jak dotychczas była znajomość procesów zachodzących podczas rozwoju faga  $\lambda$ , najbardziej znanego od lat przedstawiciela fagów lambdoidalnych. Mimo podobieństw w budowie i funkcji pomiędzy fagami lambdoidalnymi niosącymi geny toksyn Shiga a fagiem  $\lambda$ , szczegółowe mechanizmy molekularne regulujące rozwój tych pierwszych nie są jeszcze dostatecznie poznane. Szczególnie ma to znaczenie dla produkcji toksyn przez szczepy *E. coli* STEC w czasie bytowania w specyficznych warunkach panujących w świetle ludzkiego jelita. Konieczne są zatem dalsze intensywne badania nad tymi mechanizmami, które w ostateczności powinny pozwolić nam poznać sposoby zapobiegania skutkom infekcji szczepami STEC lub efektywnego leczenia. Zatem zaproponowany temat pracy doktorskiej dotyczący pogłębienia wiedzy na temat enterokrwotocznych szczepów *E. coli* jest bardzo

aktualny i niezmiernie ważny zarówno w biologii molekularnej patogenów bakteryjnych jak i medycynie i epidemiologii.

W skład prezentowanej pracy doktorskiej wchodzi trzy prace eksperymentalne współautorskie, w których Pani mgr Nejman-Faleńczyk jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje zostały wydane w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, tj. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *Microbiology* oraz *Foodborne pathogens and Disease*. Każde z tych czasopism posiada obecnie stosunkowo wysoką wartość „Impact Factor”, który zawarty jest w zakresie od 2,1 do 2,96. Każda z przedstawionych prac oryginalnych jest związana ze skonstruowanymi przez doktorantkę plazmidami pochodzącymi od bakteriofagów lambdoidalnych niosących geny *stx* (1 i 2), kodujące toksyny Shiga. Okazało się, że toksyny Shiga produkowane przez szczepy bakteryjne typu STEC są głównym czynnikiem wirulencji enterokrwotocznych szczepów *E. coli*. Naturalnym źródłem niosącym geny odpowiedzialne za produkcję tych toksyn są właśnie bakteriofagi lambdoidalne blisko spokrewnione z bakteriofagiem  $\lambda$ , bytujące w komórce bakteryjnej w postaci profaga. Po indukcji profaga i rozpoczęciu cyklu litycznego następuje masowa produkcja toksyn Shiga i ich uwolnienie po lizie komórki wskutek działalności bakteriofaga. Wycięcie DNA fagowego z chromosomu bakteryjnego i ekspresja genów kodujących białka bakteriofaga prowadzi w rezultacie do syntezy toksyn i ich uwolnienia z komórki bakteryjnej na skutek lizy. Toksyny atakują komórki nabłonkowe, co prowadzi w efekcie do ich zniszczenia i krwawej biegunki. Istotnym celem ocenianej pracy było przede wszystkim poznanie mechanizmów replikacji bakteriofagów zdolnych do produkcji toksyn Shiga, co jak wykazała doktorantka ma kolosalne znaczenie dla poziomu patogenności bakterii, chociażby ze względu na liczbę kopii genów kodujących toksyny. W związku z powyższym skonstruowano jako modele badawcze lambdoidalne plazmidy replikacyjne analogiczne do plazmidu lambda. Plazmidy te z wysoką częstością transformowały szczepy *E. coli* i były stabilne w komórkach bakteryjnych. Wyniki tego etapu pracy zostały szczegółowo opisane w świetnej publikacji w *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, która stała się pracą wyjściową dla tej rozprawy doktorskiej. W pracy tej zawarto także cenne wyniki charakteryzujące właściwości otrzymanych konstrukcji. Okazało się, że replikacja analizowanych plazmidów lambdoidalnych zależy od funkcji kodowanych w w genomie gospodarza białek szoku cieplnego Dna K, DnaJ i GrpE (podobnie jak w plazmidzie  $\lambda$ ), ale wykazano zdolność do replikacji bez udziału białka DnaA. Przyczyną tej różnicy może być różnica w sekwencji genów kodujących białka replikacyjne bakteriofaga. Kolejne badania doktorantki dotyczyły wyjaśniania różnic na poziomie regulacji transkrypcji związanego z funkcją białka DksA, które jak wykazują

wyniki, jest jednym z głównych regulatorów transkrypcji podczas odpowiedzi bakterii na warunki głodowe. Okazało się, że podczas głodzenia aminokwasowego ze względu na niski poziom transkrypcji nie zachodzi efektywna aktywacja transkrypcyjna *ori*, co wyklucza replikację DNA bakteriofaga. Te obserwacje zostały opublikowane w kolejnej pracy oryginalnej w *Microbiology*. Nic więc dziwnego, że następna praca oryginalna, opublikowana w tym razem w *Foodborne Pathogens and Disease*, zawierała wyniki kontynuujące dotychczasowe osiągnięcia. Doktorantka wykazała, iż wyniki uzyskane na skonstruowanych modelach plazmidowych potwierdzają się w przypadku rozwoju bakteriofaga. Wykazano także, że cytrynian sodu hamuje rozwój bakteriofaga, a dodatek glukozy może odwracać ten proces. Te ciekawe spostrzeżenia mają znaczenie aplikacyjne, bo pozwalają na podjęcie strategicznej decyzji o sposobie postępowania podczas przebiegu choroby. Wyniki jednoznacznie wskazują na fakt, iż w przypadku zakażenia bakteriami STEC wskazane jest przegłodzenie pacjenta, a to przede wszystkim ze względu na właściwości białka DksA.

Cel pracy doktorskiej, tj. poznanie mechanizmu regulacji replikacji DNA fagów niosących geny *stx* w odpowiedzi na różne czynniki wpływające na ten proces został w pełni zrealizowany. Praca ma charakter zarówno naukowy jak i aplikacyjny. Praca doktorska, w której skład wchodzi trzy wspomniane publikacje obarczona została krótkim wstępem w języku angielskim i polskim, opisującym przedstawione publikacje i sprawnie łączącym uzyskane w nich wyniki. Odrębnym elementem rozprawy są oświadczenia współautorów publikacji, wśród których w każdym przypadku jest Pani mgr Nejman-Faleńczyk. Jej udział we wszystkich pracach polegał na wykonaniu większości doświadczeń opisywanych w publikacjach, a także ich wspólnym planowaniu doświadczeń oraz przygotowaniu manuskryptów. Szczegółowa analiza eksperymentów realizowanych przez doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej widzianych w perspektywie przedstawionych prac oryginalnych pozwala z całą pewnością na stwierdzenie, iż rzeczywiście jest ona głównym wykonawcą przedstawionych publikacji, a publikacje te mogą tworzyć cykl prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Do największych osiągnięć rozprawy wśród licznie przedstawionych wyników w publikacjach oryginalnych należy zaliczyć udane przygotowanie warsztatu badawczego w postaci uzyskanych konstrukcji genetycznych oraz ocena i wyjaśnienie mechanizmów regulacji na poziomie transkrypcji fagów lambdoidalnych. Zaprojektowanie i uzyskanie zróżnicowanych konstrukcji plazmidowych oraz ich pełna charakterystyka biologiczna wymagała dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba eksperymentów i liczba wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej znacznie wykracza poza przeciętną.

Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr Nejman – Faleńczyk daje podstawę do dalszej pracy nad mechanizmami molekularnymi patogenezы wywoływanej przez szczepy chorobotwórcze *Escherichia coli* typu STEC. Doktorantka nie rozważa o perspektywach dalszych badań będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy, nie dyskutuje także o ewentualnych kolejnych eksperymentach prowadzących do możliwości opanowania problemu STEC na świecie, bo w ramach obecnej formy rozpraw doktorskich nie ma miejsca na takie rozważania. Chciałbym jednak poznać jej opinię na ten temat podczas obrony pracy.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska mgr Bożeny Nejman–Faleńczyk spełnia wymagania stawiane współczesnym pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy opublikowanych prac i ogrom pracy wniesiony przez doktorantkę wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, 8. 05. 2012.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
dr hab. Jacek Bielecki, prof. UW