

2016 04. 06

# NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,  
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL  
Zakład Mikrobiologii Molekularnej  
Narodowy Instytut Leków

Warszawa, 2 kwietnia 2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana Dariusza Nowickiego „Molekularne mechanizmy kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga” (tytuł angielski „Molecular mechanisms controlling development of Shiga toxin-encoding lambdoid bacteriophages”)**

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo pana prof. Dariusza L. Szlachetko, dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 22 marca 2016, z prośbą o wykonanie niniejszej recenzji.

Przedstawiono mi do oceny rozprawę pod tytułem „Molekularne mechanizmy kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga” (tytuł angielski Molecular mechanisms controlling development of Shiga toxin-encoding lambdoid bacteriophages).

Doktorant ubiega się o stopień doktora w obszarze wiedzy - nauki przyrodnicze, w dziedzinie - biologia, w dyscyplinie - mikrobiologia. Rozprawa została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz, prof. UG w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Rozprawa została przedstawiona w formie czterech publikacji wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, zgodnie z wymaganiami ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki.

Zgodnie z ustawą (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami), rozprawę doktorską może stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy. Do rozprawy dołączono dołączono oświadczenia współautorów dotyczące zakresu prac wykonanych w trakcie przygotowania publikacji, pozwalające na ocenę wkładu doktoranta.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania formalne ustawy.

## Ocena merytoryczna pracy

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące wieloautorskie publikacje opublikowane w czasopiśmie o łącznym IF 16,7

Publikacja nr 1. Nowicki D, Kobiela W, Węgrzyn A, Węgrzyn G, Szalewska-Pałasz A. *ppGpp dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in Escherichia coli*. J Bacteriol. 2013 22:5007-15. (pięcioletni IF 3.298)

Publikacja nr 2. Nowicki D, Maciąg-Dorszyńska M, Kobiela W, Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G. *Phenethyl isothiocyanate inhibits shiga toxin production in enterohemorrhagic Escherichia coli by stringent response induction*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 4:2304-15. (pięcioletni IF 4.598)

Publikacja nr 3. Nowicki D, Rodzik O, Herman-Antosiewicz A, Szalewska-Pałasz A. *Isothiocyanates as effective agents against enterohemorrhagic Escherichia coli: insight to the mode of action*. Sci Rep. 2016 6:22263. (pięcioletni IF 5.597)

Publikacja nr 4. Nowicki D, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. *Defects in RNA polyadenylation impair both lysogenization by and lytic development of Shiga toxin-converting bacteriophages*. J Gen Virol. 2015 7:1957-68. (pięcioletni IF 3.230)

Wszystkie publikacje zostały zamieszczone w recenzowanych czasopiśmie (peer review), które są zaliczane do górnych 25% czasopiśmie w danej kategorii i przeszły proces recenzji. W czasopiśmie jak te, w których ukazały się publikacje, proces oceny manuskryptu przeprowadzany jest zwykle przez dwu niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Biorąc pod uwagę ocenę publikacji przez niezależnych recenzentów i dołączając do tego własną ocenę, nie mam żadnych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

We wszystkich zaprezentowanych publikacjach, doktorant jest pierwszym autorem publikacji. W związku z tym, że publikacje są wieloautorskie, na końcu rozprawy zamieszczono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac, te oświadczenia stanowiły dla mnie podstawę do oszacowania wkładu doktoranta i tego czy przeprowadzone badania mogą stanowić podstawę do uznania przedstawionego materiału, jako rozprawy doktorskiej.

Celem badań doktoranta była analiza wpływu różnych czynników zewnętrznych, takich jak np. izotiocyaniany, stres, czy obecność mediatorów odpowiedzi ścisłej, na rozwój fagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga, identyfikację molekularnych mechanizmów, oraz wykorzystanie tej wiedzy do kontroli rozwoju wirusów oraz patogeny szczepów kodujących toksyny.

Cel, który postawił przed sobą doktorant jest ważny zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia, oprócz zdobycia wiedzy o regulacji cyklu życiowego zróżnicowanej grupy fagów, przeprowadzone badania mogą mieć zastosowanie w znalezieniu leków przeciwbakteryjnych, które w przeciwieństwie do obecnie stosowanych antybiotyków, nie będą aktywować produkcji toksyn i namnażania się fagów. Produkcja toksyn rodziny AB<sub>5</sub> przez szereg bakterii ciągle stanowi problem epidemiologiczny, zarówno w krajach o niskich dochodach gdzie bardzo groźne są zakażenia *Shigella dysenteriae* lub szczepami *Vibrio* sp. niosącymi fagi kodujące toksyny AB<sub>5</sub>, jak i w wysokorozwiniętych krajach takich jak USA, Japonia, czy ostatnio w Niemczech, gdzie epidemie wywoływane są przez enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC). Ponieważ produkcja toksyn ściśle związana jest z cyklem życiowym faga, cel rozprawy – badanie cykli życiowych wirusa w zależności od wpływu różnych czynników, stanowi logiczne poszerzenie stanu wiedzy. Doktorant realizował swoją pracę w zespole posiadającym ogromne, wieloletnie doświadczenie dotyczące regulacji rozwoju fagów lambdoidalnych.

W pracach zastosowano szereg technik eksperymentalnych takich jak:

1. Konstrukcje szeregu modyfikowanych szczepów, i plazmidów bakteryjnych
2. Wyznaczanie miana fagów



3. Oceny wielkości łysinek fagowych i wydajności lizy komórek
4. Eksperymenty wzrostowe bez lub z indukcją fagów, z różnymi substancjami dodawanymi do podłoża wzrostowego
5. Ocena wartości hamujących i bójczych substancji dodawanych do podłoża
6. Ilościowa ocena ilości fagowego DNA/RNA i jego syntezy
7. Oszacowanie poziomu produkcji ppGpp i pppGpp
8. Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu
9. Oznaczenie toksycznego wpływu lizatów bakteryjnych na komórki eukariotyczne w hodowlach komórkowych
10. Analiza ilościowa przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym
11. Analizy mikroskopowe
12. Analiza statystyczna wyników

**Publikacja nr 1** opisuje kontrolę replikacji DNA faga niosącego toksynę pod wpływem czterofosforanu guanidyny. W trakcie realizacji badań wykonano szereg eksperymentów przedstawionych na 6 rycinach. Rycina 1 (eksperymenty wykonane w całości przez doktoranta) przedstawia wpływ braku czterofosforanu guanidyny na tworzenie łysinek przez fagi  $\phi$ 24B, 933W, P22, P27, P32 w szczepie z mutacjami w genach *relA* i *spoT*. Rycina 2 i Tabela 2 (eksperymenty wykonane w całości przez doktoranta) pokazuje wpływ ppGpp na cykl życiowy wymienionych wcześniej fagów w szczepie dzikim, mutancie *relA* i podwójnym mutancie *relA-spoT* podczas głodzenia serynowego. Rycina 3 (eksperymenty wykonane w całości przez doktoranta) przedstawia wpływ mutacji *relA* i *relA/spoT* na indukcję badanych profagów. Rycina 4 (eksperymenty wykonane w całości przez doktoranta) pokazuje wzrost ilości DNA po indukcji mitomycyną C w szczepie dzikim, mutancie *relA* i podwójnym mutancie *relA-spoT*, a Rycina 5 (eksperymenty wykonane przy współudziale doktoranta) pokazuje efekt ppGpp na plazmidowe pochodne fagów. Rycina 6 (eksperymenty wykonane w całości przez doktoranta) pokazuje hamowanie ekspresji genów *stx* kodujących toksyny przez wpływ ppGpp w różnych warunkach indukcji i głodzenia.

**Publikacja nr 2** opisuje hamujący wpływ izocyjanianu fenetylu (PEITC) na produkcję toksyny w enterokrwotocznym szczepie *E. coli* warunkowany indukcją odpowiedzi ścisłej.

Rycina 1 przedstawia ilościowy wpływ PEITC na hamowanie wzrostu dzikiego szczepu *E. coli* MG1655 w laboratoryjnym podłożu, zjawisko to zostało zaobserwowane również dla klinicznych, enterokrwotocznych izolatów *E. coli*. Wyniki kolejnych doświadczeń wzrostowych z zastosowaniem PEITC i czynników indukujących takich jak mitomycyna C i nadtlenuk wodoru są zaprezentowane jako Rycina 2 i pokazują, że dodatek PEITC obniża poziom indukcji faga mierzony zarówno jako liczba łysinek z 1 ml hodowli, jak i zmiany OD. Kolejne wykonane doświadczenie przedstawia wpływ PEITC na stabilność RNA i DNA w dzikim szczepie i mutantach *relA* i *relA/spoT*. Efekt inhibicji przez PEITC może być zniesiony przez dodatek aminokwasów takich jak glicyna lub arginina (Rycina 5). W odrębnym doświadczeniu z zastosowaniem induktora głodzenia aminokwasowego pokazano, że PEITC działa jak induktor odpowiedzi ścisłej (Rycina 4). Zahamowanie produkcji toksyny podobnie jak w publikacji nr 1 rozprawy zostało pokazane poprzez obserwacje mikroskopowe produkcji fluorescencyjnego białka GFP wyrażanego z promotora *stx* w MG1655 i enterokrwotocznym szczepie serotypu O157:H7 (Ryciny 6 i 8). Wyniki doświadczeń prezentowane na wymienionych rycinach zostały wykonane przez autora rozprawy. Wykazano również, że PEITC znosi toksyczność lizatów ze szczepów enterokrwotocznych po ich inkubacji z komórkami HeLa i Vero (Rycina 7). Rycina 7 została stworzona na podstawie wyników częściowo uzyskanych przez doktoranta.

Do manuskryptu online dołączone są również trzy dodatkowe ryciny S1 do S3.

**Publikacja nr 3** kontynuuje tematykę opisaną w publikacji nr 2, czyli wpływ izocyjanianów na indukcję odpowiedzi ścisłej, hamowanie wzrostu bakterii i hamowanie indukcji fagów, a co za tym idzie ogranicza produkcję toksyny Shiga. W badaniach użyto PEITC, izocyjanianu benzylu (BITC), allilu (AITC), izopropylu (IPRITC) oraz sulforafanu (SFN). Mam pewne interpretacyjne uwagi dotyczące tych wyników. W oznaczeniach wartości MIC dla antybiotyków ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf)) stosuje się wartości wyrażone w mg/L a nie tak jak w pracy w mg/ml, w związku z tym opublikowane wartości MIC



są dość wysokie w porównaniu z antybiotykami stosowanymi przeciwko Enterobacteriaceae, np. dla BITC 70mg/L, co przy wartościach dla antybiotyków wielokrotnie przekracza stosowane dawki. Przy dalszym poszukiwaniu leków przeciw enterokrwotocznym *E. coli* należałoby znaleźć informacje, jeżeli oczywiście istnieją, na temat farmakokinetyki i farmakodynamiki tych związków i jakie jest możliwe stężenie tych związków w miejscach docelowych organizmu gospodarza objętych infekcją. Będzie można uzyskać odpowiedź czy wartość 1/8 MIC, która hamuje indukcję faga, co pokazano w publikacji, jest możliwa do osiągnięcia w tkankach. Interesująca jest też możliwość zastosowania izocyjanianów jako dodatku do antybiotyków, który hamuje indukcję fagów i produkcję toksyny.

Doktorant wykonał doświadczenia zaprezentowane na rycinach 2A, 3 AB, 4BC i 5, oraz częściowo wykonał doświadczenia zaprezentowane na rycinach 2B, 3C, 4AD, 6 i w tabeli 2, co stanowi znaczący udział w wykonaniu części eksperymentalnej.

**Publikacja nr 4** opisuje wpływ poliadenylacji na cykl lityczny i lizogenny bakteriofagów kodujących toksyny Shiga. Wpływ poliadenylacji na cykl życiowy wirusów kodujących toksynę Shiga był zainspirowany obserwacją, że bakteriofag lambda niosący mutację w genie *pcnB* kodującym polimerazę I poli(A) ma zaburzony cykl lizogenny. Doktorant wykazał, że podobna zależność jest obserwowana dla fagów niosących toksynę Stx takich jak  $\phi$ 24B, 933W, P22, P27 czy też P32. Dodatkowo, zaobserwowano różnice w indukcji faga pomiędzy szczepem dzikim a niosącym mutację *pcnB*, co wykazało wpływ zarówno na cykl lityczny jak i lizogenny. W dalszych eksperymentach wykazano wpływ mutacji *pcnB* na syntezę DNA fagów. Analiza poziomu transkrypcji genów fagowych wykazała, że poziom transkrypcji genów wczesnych jest wyższy w mutancie *pcnB*, a później sytuacja ulega odwróceniu. Najbardziej znaczące różnice dotyczyły genów odpowiedzialnych za regulację i inicjację cyklu litycznego. Zaobserwowano również wyraźny wzrost produkcji transkryptu *pcnB* w komórkach niosących fagi w porównaniu z komórkami dzikimi w określonym punkcie czasowym. Wy tłumaczenie obserwowanych zjawisk autorzy tłumaczą tym, że zwolnienie tempa wzrostu związane z warunkami stresowymi dla komórki związanymi z indukcją fagów powoduje wzmocnienie ekspresji *pcnB* i wydajniejszą poliadenylację różnych transkryptów co może prowadzić do wydajniejszej degradacji poliadenylowanych transkryptów w dzikim szczepie. W szczepach z mutacją *pcnB* degradacja nie zachodzi wydajnie, co prowadzi do akumulacji niezdegradowanych fagowych transkryptów. Sytuacja ta może dotyczyć różnego rodzaju regulatorowych RNA.

Wyniki różnorodnych analiz genomowych i transkrypcyjnych sugerują, że regulacja poprzez cząsteczki RNA jest znacznie bardziej rozpowszechniona niż sądzono. W mobilnych elementach genetycznych często zdarza się regulacja np. procesów regulacji inicjacji replikacji odbywa się przez antysensowny RNA. Szacuje się również, że około 30% genów w *E. coli* jest regulowane przez małe, regulatorowe RNA. W związku z tym, chciałabym się dowiedzieć od doktoranta, jakie inne, potwierdzone lub być może nowo odkryte systemy regulacji genów fagowych występują u bakterii innych gatunków niż należące do rodziny Enterobacteriaceae.

Doktorant wykonał doświadczenia zaprezentowane na rycinach 1, 2, 3 i w tabelach 1 i 2.

We wszystkich publikacjach doktorant brał udział w planowaniu doświadczeń, analizie i opracowywaniu wyników, dyskusji, współredagowania manuskryptu i finansowaniu prac. Praca była współfinansowana w ramach projektu VENTURES/2012-9/7 "Zastosowanie sRNA w terapii kierowanej przeciw zakażeniom enterokrwotocznymi szczepami bakterii *Escherichia coli*" realizowanego w ramach programu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego; oraz "Programu wdrożenia nowoczesnych elementów kształcenia w Uniwersytecie Gdańskim", Komponentu "Stypendia naukowe dla doktorantów szansą na rozwój gospodarki", Projekt realizowany jest w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Priorytetu IV, Działania 4.1, Poddziałania 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Dodatkowe źródła finansowania badań to 3 granty NCN dla współautorów publikacji.

#### **Podsumowanie**

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy, mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalne znaczenie aplikacyjne. Wyniki zaprezentowanych badań wskazują, iż bakteryjne systemy kontroli ekspresji genów mogą stanowić molekularny cel w kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych niosących geny toksyn. Różnice genetyczne badanych wirusów mają istotny wpływ na efektywność kontroli rozwoju cyklu życiowego tych bakteriofagów z udziałem mechanizmów gospodarza. W trakcie badań przetestowano szereg substancji o działaniu hamującym wzrost bakterii - izotiocyjanianów, oraz pokazać mechanizm działania prowadzący do aktywacji kontroli ścisłej metabolizmu na drodze głodzenia aminokwasowego.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pana magistra Dariusza Nowickiego w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykułe 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z prośbą o dopuszczenie pana mgr Dariusza Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i składam wnioszek o wyróżnienie rozprawy.

Dr. hab. *Wioletta Szymańska*