



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

19pt. 05. 11. 2019r.

Wrocław, 2019-10-30

Dr hab. Krystyna Dąbrowska
Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirsfeld.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Dydeckiej

pt. „Rola genów i otwartych ramek odczytu zlokalizowanych w rejonie *exo-cis* fagów lamboidalnych w rozwoju tych fagów.”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Dydeckiej została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Alicji Węgrzyn (Promotor) przy opiece pomocniczej Pani dr Bożeny Nejman-Faleńczyk (Promotor pomocnicza), w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Praca dotyczy rozwoju bakteriofagów lamboidalnych grupy stx i jest poświęcona problemowi identyfikacji roli genów i otwartych ramek odczytu (ORF) ulokowanych w sprecyzowanym rejonie *exo-cis* genomu tych fagów. Rozprawa została wykonana w formie zbioru publikacji naukowych opatrzonych polskojęzycznym i angielskojęzycznym streszczeniem oraz uzupełnionym o listę dorobku naukowego autorki rozprawy. Cykl publikacji zawiera wyniki badań w zakresie regulacji lizogenizacji i indukcji profagów, w szczególności roli genów regionu *exo-cis* w ekspresji typu S.O.S. gospodarza i regulowania funkcji bakteriofagów badanej grupy, a także identyfikacji funkcji wybranych bakteriofagowych otwartych ramek odczytu.

Tematyka pracy, obejmująca w najogólniejszym zakresie biologię bakteriofagów i ich interakcje z gospodarzem bakteryjnym, wpisuje się w doceniony w ostatnich latach problem



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

wpływu mikroorganizmów tworzących mikrobiom na zdrowie człowieka. W ostatniej dekadzie nastąpił wyraźny wzrost świadomości, jak znaczącą rolę dla naszego zdrowia odgrywa skład szeroko rozumianego mikrobiomu i indywidualne właściwości konkretnych szczepów mikroorganizmów należących do niego. Co ważne, uświadomiono sobie również złożoność i różnorodność frakcji fagowej, wywierającej znaczący wpływ na żyjące w organizmach ludzi i zwierząt bakterie. Przedmiotem pracy doktorskiej przedstawionej do oceny przez mgr Aleksandrę Dydecką są bakteriofagi należące do szczególnej grupy: grupy stx, które zdolne są do konwersji bakterii w kierunku produkcji toksyn Shiga.

Toksyny Shiga produkowane przez niektóre szczepy bakterii są odpowiedzialne za zwiększoną wirulencję tych szczepów bakteryjnych. Powodują one ostre zatrucia pokarmowe, a nasilenie objawów może stanowić nawet zagrożenie życia osoby zarażonej. Szczególnie w ostatnich latach mnożą się doniesienia o infekcjach powodowanych przez niebezpieczne szczepy typu EHEC (ang. Enterhemorrhagic *Escherichia coli*), do szczególnie niepokojącej ze względu na zasięg i skutki epidemii doszło w 2011 roku w Niemczech, odnotowano ponad 50 zgonów wywołanych infekcją. Co szczególnie ważne, produkcja toksyn Shiga przez bakterie następuje w obecności genów *stx* zlokalizowanych w genomach bakteriofagów, które w bakteriach występują jako profagi. Zatem podjęta przez mgr Aleksandrę Dydecką tematyka ma bezpośrednie przełożenie na rozwiązania dotyczące ważnego problemu zdrowotnego z jakim zmagają się społeczeństwo zarówno w skali kraju, jak i w skali międzynarodowej, ponieważ zagrożenie szczepami typu EHEC ma charakter globalny.

Co ważne, bakteriofagi nadające bakteriom zdolność produkcji toksyn Shiga to bakteriofagi mogące wchodzić w stadium profaga, czyli tzw. bakteriofagi łagodne, które zamiast natychmiastowej lizy zainfekowanej bakterii włączają swój materiał genetyczny w genom bakteryjny i wytwarzają tzw. stan lizogenii. Różne czynniki środowiskowe, w tym chemiczne, mogą powodować indukcję profaga połączonej z produkcją wielu fagów potomnych, a także dużej ilości toksyny Shiga. Pani mgr Aleksandra Dydecka podjęła się ambitnego zadania zrozumienia, jakie elementy genetyczne i w jaki sposób mogą regulować fagową „decyzję” o wejściu w stan lizogenii i utrzymywaniu się w formie profaga



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

lub o przejściu w cykl lityczny, kończący się śmiercią bakteryjnego gospodarza. Zagadnienia te leżą u podstaw zrozumienia patogenności szczepów bakteryjnych typu EHEC.

Pierwsza z prac wchodzących w skład przedstawionego cyklu została opublikowana w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* w roku 2016 (*Oxid Med Cell Longev.* 2016, 8453135). W pracy tej dokonano analizy wpływu regionu *exo-xis* na indukcję profaga wymuszoną nadtlaniem wodoru lub za pomocą światła UV. W tym celu przygotowany został zestaw mutantów delecyjnych, obejmujący mutanty pozbawione całego regionu lub poszczególnych jego elementów, w bakteriofagach lambda lub phi24B. Analizowano i porównywano wydajność indukcji profagów u poszczególnych mutantów. Badanie pozwoliło na ujawnienie znaczącego zahamowania indukcji faga phi24B nadtlaniem wodoru. Co ciekawe, nie obserwowano tego efektu w wypadku indukcji za pomocą UV, a w wypadku mutantów faga lambda efekt był nieznaczny. Stwierdzono też obniżenie ekspresji fagowych genów regulatorowych oraz bakteryjnych genów biorących udział w odpowiedzi S.O.S. Usuwanie poszczególnych ORF lub genów przyniosło w wypadku faga phi24B wyniki zbieżne z tymi obserwowanymi dla mutantów pozbawionych całego regionu: następowało opóźnienie indukcji profagów pod wpływem nadtlenu wodoru. Praca zawiera szeroki zestaw różnorodnych wyników, składających się na ciekawe konkluzje naukowe. Pani mgr Aleksandra Dydecka zajmuje w tej pracy miejsce pierwszego autora wspólnie z równorzędnym pierwszym autorem: mgr Katarzyną Licznorską. Z tego powodu wyszczególniony wkład każdej z autorek w wykonanie pracy powinien być przedstawiony jak najbardziej szczegółowo, aby nie pozostawiać domyślnego zakresu prac wykonanych przez Doktorantkę prezentującą tę pracę jako część rozprawy doktorskiej. W oświadczeniach autorskich obie współautorki deklarują m.in., że ich wkład polegał na „współudziale w przygotowaniu fagowych mutantów delecyjnych”, rozumiem, że w wypadku Pani mgr Katarzyny Licznorskiej były to delecje całego regionu *exo-xis*, w wypadku Pani mgr Aleksandry Dydeckiej delecje poszczególnych genów i otwartych ramek odczytu. Jako, że każda z Autorek deklaruje, że wyniki wynikające z jej pracy znajdują się w Tabeli nr 4, z formalnego obowiązku proszę Panią Aleksandrę Dydecką o uszczegółowienie informacji na temat jej wkładu w wyniki zgromadzone w Tabeli 4.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Druga praca przedstawionego cyklu została opublikowana w piśmie *Frontiers in Microbiology* w roku 2017 (*Front Microbiol* 8:1618) i jest poświęcona identyfikacji funkcji wybranego elementu regionu *exo-xis*: był to *orf63* u faga lambda i faga phi24B. Praca opiera się na imponującym zestawie technik i metod inżynierii molekularnej, w tym celowanej delecji w genomach fagowych oraz komplementacji z wykorzystaniem odpowiednich konstrukcji plazmidowych. Tu również zbadano wymuszoną nadtleniem wodoru indukcję profagów. Zaobserwowano obniżenie wydajności przejścia w fazę lityczną, a w wypadku faga phi24B także jego opóźnienie. W doświadczeniu typu „one step growth” doktorantka stwierdziła jedynie nieznaczne podwyższenie tzw. plonu fagowego u mutantów. Doktorantka wysuwa wniosek, że przy braku funkcjonalnego produktu Orf63 dochodzi do upośledzenia wydajności procesu indukcji. W tym miejscu powstaje pytanie o nieco bardziej rozbudowaną prezentację tego problemu i analizę związku/zależności, jakie mogły wystąpić w tym wypadku. Jakie procesy i inne białka istotne w rozwoju faga mogą pozostawać pod bezpośrednim wpływem Orf63?

W dalszej części pracy znajdujemy badanie komplementacji wprowadzonych do genomów fagowych delecji za pomocą konstrukcji opartych na plazmidach pUC, które zawierają *orf63*. Badanie ujawniło różnicę pomiędzy skutkami komplementacji obserwowanymi u faga lambda (tu wystąpiła skuteczna komplementacja) i u faga phi24B (tu pełna komplementacja nie wystąpiła). Jako możliwe wyjaśnienie tej obserwacji Doktorantka podaje silniejszą zależność fagów Stx od właściwej ilości produktu *orf63* w porównaniu do fagów lambda, które mogłyby być mniej wrażliwe. Jakie inne możliwości mogłyby występować? Czy jest np. możliwe, aby produkty elementu *orf63* pochodzącego z faga lambda były ekspresjonowane wydajniej niż ich odpowiedniki pochodzące z faga phi24B i tym samym łatwiej osiągały efektywne stężenie w komórce bakteryjnej? Jaki jest poziom homologii i ewentualne różnice pomiędzy tymi sekwencjami występującymi u obu bakteriofagów, np. w zakresie częstości użycia kodonów?

Trzecia praca wchodząca w skład cyklu została opublikowana w piśmie *Viruses* w roku 2018 (*Viruses* 10(10):553) i przedstawia analizę kolejnych elementów regionu *exo-xis*: *orf61* oraz *orf60a*. Ta praca również opiera się na rozbudowanej analizie mutantów delecyjnych badanych regionów w fagu lambda i fagu phi24B. Analiza pozwoliła na wykazanie,



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

że przy braku funkcjonalnych produktów *orf61* i *orf60a* profagi podlegają mniej wydajnej indukcji nadtleniem wodoru, ale także udało się zaobserwować, że proces lizogenizacji bakterii jest znacznie bardziej efektywny. Wskazuje to na istotną rolę regulacyjną badanych ORF w tzw. decyzji „liza czy lizogenia”. Po raz kolejny zaobserwowano różnicę pomiędzy fagiem lambda a fagiem phi24B, przy czym efekt był silniejszy w wypadku tego drugiego szczepu fagowego. Tu powstaje pytanie: jak możemy próbować wyjaśnić występowanie takich różnic pomiędzy tymi podobnymi bakteriofagami?

Na koniec chciałabym przenieść dyskusję na poziom bardziej ogólny i prosiłabym, aby Doktorantka rozwinęła problem znaczenia biologicznego badanych przez siebie zjawisk, w nieco szerszym, ewolucyjnym kontekście:

1. Jakie znaczenie dla faga może mieć powiązanie pomiędzy aktywnością produktów regionu genomu fagowego *exo-xis* z bakteryjnym systemem S.O.S.?
2. Jak można wyjaśnić dość szczególny moment aktywacji ekspresji toksyn Shiga-dlaczego te tak szkodliwe dla człowieka produkty są w ogóle kodowane przez bakteriofagi i dlaczego są uaktywniane właśnie w związku z wejściem faga w cykl lityczny?

Co do formalnej strony dysertacji, Pani mgr Aleksandra Dydecka wybrała formę cyklu trzech publikacji oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, cykl został opatrzony polskojęzycznym i angielskojęzycznym wstępem. Taka forma doskonale spełnia nie tylko wymogi formalne, a także współczesne oczekiwania dotyczące eksperymentalnych prac doktorskich. Warto podkreślić, że na cykl składają się aż trzy prace o charakterze badawczym (oryginalne), opublikowane w pismach punktowanych w zakresie od 3,811 do 4,868 (Impact Factor). Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym, choć Doktorantka nie uniknęła drobnych przypadków żargonu naukowego i zapożyczeń językowych: „namnażanie”, sekwencje „wysoko zakonserwowane”, profagi „rekombinowane”. Powyższe określenia warto byłoby zastąpić innymi, lepiej brzmiącymi w języku polskim. Z formalnego obowiązku wspomnę o kilku literówkach:

- „lamdoidalnych” str. 6,



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

- „z wykorzystaniem lizogennych mutantami delecyjnymi” str. 10,
jednak chciałabym podkreślić, że rozprawa została przygotowana bardzo starannie i
czytanie jej było prawdziwą przyjemnością.

Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą, jestem przekonana, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników, z pewnością spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Przeprowadzone badania dowodzą dużych umiejętności Doktorantki w poprawnym posługiwaniu się nowoczesnymi metodami badawczymi. W pracy wykorzystano szereg metod z zakresu biologii molekularnej (konstrukcja szczepów delecyjnych w wielu wariantach, przygotowanie plazmidowych konstrukcji ekspresyjnych), mikrobiologii (hodowla bakterii i bakteriofagów, analizy cyklu fagowego), i in.. 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 i sporego „rozmachu” prowadzonych badań.

Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą wart docenienia wkład w rozwiązywanie aktualnych problemów związanych ze zdrowiem człowieka. Rozprawa została napisana przejrzysto pod względem językowym. Zauważone drobne błędy oraz dodatkowe pytania w niczym nie umniejszają wartości rozprawy. Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Dydeckiej 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 (tj. Dz.U. z 2016 r., poz. 882 ze zm.). Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy.

Dr hab. Krystyna Dąbrowska

Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Krystyna Dąbrowska

