

Dr hab. Michał Arabski, prof. UJK
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Maciejewskiej pt. *„Przygotowanie rekombinowanych endolizyn fagów Klebsiella-specyficznych i określenie ich aktywności bakteriobójczej oraz wpływu na komórki ludzkie”*

Skuteczność antybiotykoterapii w świetle narastającej liczby szczepów lekoopornych oraz nieprawidłowościach w stosowaniu antybiotyków w warunkach klinicznych jest obecnie poważnym problemem o zasięgu międzynarodowym. Wskazują na to nie tylko dane kliniczne lecz również ilość projektów naukowych, których celem bezpośrednim lub pośrednim jest poszukiwanie skutecznych, nowych metod walki z patogenami. Istotną obserwacją wynikającą z tych poszukiwań jest fakt, że obok rozwiązań mających za zadanie polepszenie właściwości farmakokinetycznych i/lub farmakodynamicznych „klasycznych” antybiotyków (nośniki leków, modyfikacje chemiczne), na pierwszy plan wysuwają się szeroko rozumiane terapie alternatywne. Badania nad nowymi związkami o właściwościach bakteriobójczych (np. peptydy, kompleksy metali, nanozwiązki) czy też wykorzystanie specyficznego efektu bójczego bakteriofagów wobec bakterii wymagają podejścia interdyscyplinarnego, co warunkuje optymalizację terapii do warunków klinicznych tj. maksymalna skuteczność i specyficzności eradykacji bakterii przy możliwie minimalnym efekcie ubocznym na komórki eukariotyczne.

W świetle powyższych rozważań przedstawiona mi do recenzji praca to bardzo ciekawy przykład interdyscyplinarnego podejścia do aktualnego problemu naukowego, którego konkretne rozwiązanie praktyczne ma potencjalne zastosowanie w lecznictwie. Mgr Barbara Maciejewska w wykonanej przez siebie pracy doktorskiej podjęła udaną próbę charakterystyki genomów pięciu fagów *Klebsiella*-specyficznych w kierunku identyfikacji i analizy genów endolizyn oraz holin fagowych. W wyniku ekspresji genów kodujących endolizyny, w tym zmodyfikowanego genu endolizyny faga KP34 oraz dwóch holin fagów KP32 oraz KP34 uzyskała wysokooczyszczone białka rekombinowane endolizyn o aktywności amidazy, endopeptydazy oraz lizozymu z sygnałem peptydowym. Ponadto, potwierdziła aktywność przeciwbakteryjną powyższych białek rekombinowanych oraz brak właściwości cytotoksycznych wobec komórek linii A549 z zastosowaniem testu MTT. Uzyskane wyniki, opis metodyki pracy oraz wstęp teoretyczne przedstawiła w formie rozprawy doktorskiej o budowie tradycyjnej dla prac doświadczalnych. Praca liczy 183 strony i zawiera 59 rycin, 68 wykresów (błąd w numeracji wykresów w ich spisie; str. 177) oraz 16 tabel. W poniżej recenzji odniosłem się do poszczególnych części (rozdziałów) pracy doktorskiej:

Wprowadzenie

We wstępie pracy Autorka w sposób interesujący i uporządkowany przedstawia strategię uwalniania bakteriofagów z bakterii, koncentrując się na enzymach fagowych tj. holinach, spaninach oraz w szczególności endolizynach. W przypadku endolizyn, Autorka przedstawia ich klasyfikację, właściwości fizyko-chemiczne, specyficzność oraz zastosowanie praktyczne. Ta 28 stronicowa część pracy napisana w sposób syntetyczny w pełni przybliża tematykę części doświadczalnej pracy, jej cel oraz dobór metod badawczych. Kolejność poszczególnych podrozdziałów jest logiczna. Na uwagę zasługuje fakt, iż Autorka opisując specyfikę substratową enzymów fagowych, ich termostabilność czy też potencjał antibakteryjny odnosi się nie tylko do aspektu poznawczego powyższych zagadnień lecz również aplikacyjnego. Wymiar praktyczny przeprowadzonych badań naukowych to niewątpliwie zaleta rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Maciejewskiej. Istotne dopełnienie opisywanych zjawisk stanowią ryciny i wykresy, których opisy powinny być jednak przetłumaczone na język polski, dotyczy to wykresu 1, str. 9; ryciny 1, str. 12 oraz ryciny 8, str. 36. W tej części pracy występują nieliczne błędy edytorskie jak „N-terminalny”, str. 20; opis na rycinie 6, str. 21; „spectrum” str. 28. Ogólnie praca jest dobrze zredagowana a nieliczne błędy dotyczące poprawności pisowni (biorąc pod uwagę jej objętość) nie wpływają na jej meritum, więc nie będę ich cytować.

Cel pracy i hipotezy badawcze

Cel pracy jak również hipotezy badawcze sformułowane jasno, w przemyślanym ciągu logicznym zostały w pełni zrealizowane. Autorka bardzo precyzyjnie określa zakres pięciu zadań przewidzianych do realizacji w części badawczej rozprawy składających się na „przygotowanie i przebadanie aktywności antibakteryjnej, a także wpływu na komórki ludzkie, endolizyn fagów litycznych, specyficznych wobec *Klebsiella*: K11, KP15, KP27, KP32 oraz KP 36”. Dodatkowym celem była charakterystyka i przebadanie aktywności antibakteryjnej holin fagów KP32 oraz KP34. Jedyne moje zastrzeżenie do tej części rozprawy budzi uogólnienie związane z oceną „wpływu endolizyn fagowych na komórki ludzkie”. Sądzę, że Autorka powinna opisywać efekt badanych białek rekombinowanych w odniesieniu do linii komórkowej A549 a nie uogólniać wnioski z uzyskanych danych eksperymentalnych w stosunku do szerokiego pojęcia jakim są komórki ludzkie.

Materiały i Metody

Niewątpliwą zaletą pracy doktorskiej jest szeroki wachlarz metod jaki zastosowała w niej Autorka. Obok narzędzi bioinformatycznych (18 aplikacji) i technik biologii molekularnej Autorka opisał i zastosowała w części doświadczalnej metody preparatywne oraz mikrobiologiczne techniki hodowlane. Bardzo szczegółowy i uporządkowany ich opis wraz z charakterystyką pozwala w pełni na odtworzenie części doświadczalnej pracy. Autorka w sposób sumienny przedstawiła Czytelnikowi nie tylko procedurę zastosowanych metod lecz również algorytm postępowania, który w ujęciu całościowym rozprawy pozwolił jej na realizację zamierzonego celu badawczego: od analizy *in silico* genów bakteriofagów, uzyskania wysokooczyszczonych fagowych białek rekombinowanych przy użyciu m.in. bakteryjnego systemu ekspresyjnego do oceny ich właściwości przeciwbakteryjnych wobec

wybranych szczepów bakteryjnych: *Burholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serowar Enteritidis, *Staphylococcus aureus* i *epidermidis* oraz właściwości cytotoksycznych z zastosowaniem testu MTT wobec komórek linii A549. Moje zastrzeżenie budzi pod kątem edytorskim brak kropek po skrótach jednostek np. min. oraz użycie określenia „paleta komórek”, jak sądzę, w odniesieniu do ich osadu.

Wyniki

Na szczególną uwagę zasługuje ilość danych doświadczalnych. Uzyskane wyniki eksperymentalne Autorka przedstawiła na 82 stronach rozprawy. Na wyróżnienie zasługuje bogaty warsztat badawczy w postaci uzyskanych konstrukcji genetycznych na podstawie bogatej i skrupulatnej analizy bioinformatycznej genów kodujących endolizyny fagowe. Świadczy to o pracowitości oraz umiejętności organizacji pracy laboratoryjnej. Autorka w usystematyzowany sposób zinterpretowała wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań tj. analizy *in silico* genów kodujących białka fagowe, preparatyki wektorów ekspresyjnych zawierających powyższe geny, efektów ekspresji i oczyszczania białek rekombinowanych oraz ich właściwości biologicznych tj. aktywności przeciwbakteryjnej oraz cytotoksyczności. Wnioski, rozważnie wysnute na podstawie uzyskanych wyników, uwiarygodniają pod kątem merytorycznym liczne ryciny, schematy oraz zestawienia tabelaryczne. Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak przekazać pewne uwagi formalne do tej części pracy. Na rycinach obrazujących wyniki badań zamieszczone w rozdziałach 4.1.10 oraz 4.1.12 powinny znaleźć się odchylenia standardowe dla poszczególnych stężeń. Ponadto wykresy te powinny być raczej w formie punktowej z naniesieniem krzywej regresji liniowej z podaniem jej współczynnika R^2 . Sądzę, że tytuły wykresów w jego strukturze (górny panel) oraz wzory funkcji krzywych można było pominąć. Istotnym elementem pracy doświadczalnej w zakresie nauk eksperymentalnych jest m in. analiza statystyczna uzyskanych wyników. Autorka podaje informacje dotyczące jedynie ilości powtórzeń, co jest cenną informacją (str. 63), jednak prezentacji wyników w zaproponowanej przez mnie formie umożliwiła by ich analizę statystyczną, co dodatkowo wzmacnia wysnute wnioski np. różnice statystyczne aktywności endolizyn w zależności od ich stężenia w stosunku do kontroli.

Dyskusja i Wnioski

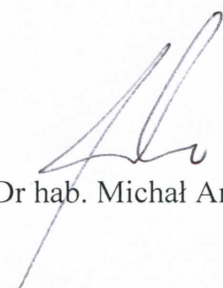
Treści merytoryczne zawarte w rozdziale Dyskusja jednoznacznie wskazują na głębokie zrozumienie tematyki badań przez Autorkę, zrealizowanych z wykorzystaniem bardzo szerokiego spektrum metod badawczych. Odnosząc się do najnowszych danych literaturowych trafnie wskazuje na innowacyjny charakter pracy, który wiąże się z *optymalizacją procedur przygotowania rekombinowanych, wysokooczyszczonych endolizyn kodowanych przez fagi Klebsiella-specyficzne*. Bardzo istotnym wnioskiem nasuwającym się po przeczytaniu powyższego rozdziału jest jego wymiar metodyczny. Autorka w sposób sumienny przedstawia problemy badawcze jakie towarzyszyły jej podczas realizacji części doświadczalnej rozprawy i w zdecydowanej większości przypadków doskonale je rozwiązała m in. analiza genomów bakteriofagów. Na podstawie rzeczowo zinterpretowanych wyników własnych, danych literaturowych oraz wiedzy praktycznej Autorka podjęła trafnie oraz

profesjonalnie próbę ekspresji białek toksycznych tj. endolizyn. Bardzo ciekawą obserwacją i jej konsekwencją o znaczeniu poznawczym, co Autorka szczegółowo opisuje, jest pozytywny wynik amplifikacji sekwencji kodującej lizynę faga KP27 z zastosowaniem polimerazy wykazującej tolerancję względem reszt uracylu. Ponadto o znajomości tematyki badawczej zrealizowanej w rozprawie świadczy wybór obecnie stosowanych technik pozwalających na określenie aktywności enzymów litycznych z zastosowaniem permeabilizowanej hodowli bakteryjnej. Pod względem formalnym mam jedynie zastrzeżenia do niektórych określeń jak: *Zazwyczaj ekspresja podstawowa jest na tak niskim poziomie, że powstającego białka toksycznego jest zbyt mało, by wyrządzić krzywdę komórkom*; str. 153 oraz *zdolność atakowania konserwatywnego miejsca*; str. 156. Autorka przedstawia osiem wniosków, będących pochodną szeroko zakrojonych badań. W przypadku wniosku nr. 5 interpretacja powinna być ograniczona do zastosowanej linii komórkowej.

Wniosek końcowy

W wyniku analizy merytorycznej oraz formalnej rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Maciejewskiej z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane współczesnym pracom doktorskim, zwłaszcza jej aspekt aplikacyjny i interdyscyplinarny. Autorka wykazała się zrozumieniem tematyki badań, opanowała szeroki wachlarz metod z dziedziny bioinformatyki, biologii molekularnej, biochemii oraz mikrobiologii. Kompetencje Autorki w świetle znaczących z punktu widzenia praktycznego oraz poznawczego wyników oceniam bardzo wysoko. Na podstawie pozytywnej oceny przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej, spełniającej wymogi Ustawy o tytułach i stopniach naukowych, wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Barbary Maciejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę ilość wykonanej pracy badawczej z wykorzystaniem szeregu technik nadających jej wymiar praktyczny, pragnę również zgłosić rozprawę Pani mgr Barbary Maciejewskiej do wyróżnienia przez Radę Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.



Dr hab. Michał Arabski