



Wrocław 18.08.2014

Dr hab. Dagmara Jakimowicz
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
dagmara.jakimowicz@uni.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Maciejewskiej
zatytułowanej:

„Przygotowanie rekombinowanych endolizyn fagów *Klebsiella* - specyficznych i określenie ich
aktywności bakteriobójczej oraz wpływu na komórki ludzkie”

wykonanej w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii
pod kierunkiem dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy

W dobie narastającego problemu antybiotykoodporności trwają poszukiwania alternatywnych środków bakteriobójczych. Uważa się, że bakteriofagi, jako wirusy dostosowane ewolucyjnie do niszczenia bakterii, mogą być potencjalnie wykorzystane w terapii zakażeń bakteryjnych. Rozważanych jest kilka strategii wykorzystania fagów w medycynie, od klasycznej terapii z zastosowaniem fagów litycznych, poprzez stosowanie zmodyfikowanych wirusów, aż po użycie enzymów pochodzenia fagowego, takich jak endolizyny niszczące ścianę komórkową bakterii. Właśnie tematem endolizyn zajęła się mgr Barbara Maciejewska w swojej pracy doktorskiej. Temat ten jest powiązany z zainteresowaniami naukowymi dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy i jak wspomniano, dotyczy bardzo aktualnego zagadnienia związanego z poważnym problemem infekcji szczepami antybiotykoopornymi.

Celem pracy doktorskiej było poszukiwanie i analiza aktywności przeciwbakteryjnej endolizyn, a także holin fagów litycznych, specyficznych wobec różnych szczepów bakterii rodzaju *Klebsiella*. Badania te mają istotne znaczenie ze względu na dotąd napotykaną duże trudności w odnalezieniu enzymów fagowych działających na ścianę komórkową bakterii Gram ujemnych. W celu realizacji projektu doktorskiego Doktorantka wykonała analizy komputerowe genomów szeregu bakteriofagów i zidentyfikowała geny kodujące potencjalne endolizyny oraz holiny. Następnie podjęła próby ekspresji genów kodujących wyżej wspomniane enzymy i oczyszczenia białek rekombinowanych. To trudne, ze względu na oczywistą toksyczność produkowanych białek, zadanie badawcze zakończyło się częściowym sukcesem. Enzymy, które udało się Doktorantce oczyścić zostały wykorzystane w standardowych testach aktywności antybakteryjnej względem kilku szczepów bakterii Gram ujemnych

oraz Gram dodatnich. Ostatnim etapem projektu było zbadanie potencjalnych własności toksycznych wobec komórek ludzkich, weryfikacja taka jest koniecznym etapem optymalizacji terapii przeciwbakteryjnej z wykorzystaniem endolizyn.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Maciejewskiej jest przygotowana w sposób typowy dla tego typu opracowań. W obszernym **Wstępie** Doktorantka skupiła się na opisie przede wszystkim przebiegu infekcji fagowej, z zaakcentowaniem różnic w cyklu rozwojowym fagów i ze zwróceniem szczególnej uwagi na drogi uwalniania fagów z komórki. Następnie przeszła do dokładnego omówienia struktury i funkcji endolizyn oraz opisu dotychczasowego stanu wiedzy na temat zastosowania endolizyn w medycynie i przemyśle. Uważam, że we Wstępie wskazane byłoby nieco dokładniejsze omówienie budowy peptydoglikanu i pozostałych osłon komórkowych bakterii, które co prawda są przedstawione na rysunku na stronie 14, ale w tekście są tylko wspomniane. Byłoby to przydatne ze względu na fakt, że zarówno we Wstępie, jak i w dalszych częściach pracy Doktorantka wymienia poszczególne wiązania w cząsteczce peptydoglikanu hydrolizowane przez rozmaite endolizyny. Zagadnienie to mogłoby być rozszerzone kosztem obszernej tabeli zbiorczej zestawiającej wszystkie do tej pory opisane w literaturze endolizyny, która to tabela z powodzeniem mogłaby stanowić załącznik. Wstęp zawiera liczne rysunki pomocne w zrozumieniu tekstu, niedopatrzaniem jednak są błędne w większości przypadków odnośniki do rysunków w tekście. Pomimo tych uwag, uważam, że Wstęp spełnia zadanie wprowadzenia czytelnika w zagadnienia poruszane w dalszej części pracy.

Cele i hipotezy badawcze pracy zostały jasno sprecyzowane. **Materiały i metody** zawierają zestawienie szczepów i konstrukatów, uzupełnione przydatnym rysunkiem przedstawiających ich mapy, listę starterów i odczynników oraz opis stosowanych metod. Metody te, to standardowe metody klonowania, ekspresji genów w układach ekspresyjnych *E. coli*, oraz oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej endolizyn, poprzez analizę zmiany gęstości optycznej hodowli bakterii. Zastosowanie wybranej metodyki badawczej nie budzi zastrzeżeń, w przypadku jednak genów trudnych do ekspresji w systemach bakteryjnych można by rozważyć zastosowanie innego systemu ekspresji. Doktorantka porusza ten temat w rozdziale Dyskusja, jednak w ramach dalszej dyskusji chciałabym poprosić o szersze przedstawienie takich możliwości, na przykład potencjalne zastosowanie systemów bakulowirusowych.

Rozdział **Wyniki** rozpoczyna się od przedstawienia analiz komputerowych sekwencji badanych enzymów fagowych. Analizy te, wykonywane przy pomocy ogólnie dostępnych narzędzi bioinformatycznych, zasugerowały istnienie domen odpowiedzialnych za aktywność enzymatyczne takie jak peptydazowa lub amidazowa, poszukiwano także domen wiążących peptydoglikan i domen transmembranowych. Wyniki tego typu analiz wymagają weryfikacji biochemicznej i dlatego w dalszej

części Wyników Doktorantka przedstawia klonowanie i próby oczyszczania kolejnych enzymów w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Wyniki te przedstawiono w postaci analiz elektroforetycznych. Niektóre z przedstawionych rysunków zawierają błędy w opisie np. na stronie 90, w rysunku 47 i podobnie na stronie 92 w rysunku 50 brakuje opisu 2 ścieżek, natomiast na stronie 88, w legendzie do rysunku znalazł się opis 4 ścieżek, podczas gdy na rysunku widoczne są tylko 2. Przy przedstawianiu analiz elektroforetycznych przydatne byłoby podanie wielkości oczekiwanych produktów oraz opisanie prążków markera. W opisie izolacji białek nie podano, jakie ilości i stężenia białek uzyskano, co w przeliczeniu na objętość hodowli dałoby informacje o wydajności oczyszczania. Część Wyników poświęcona oczyszczaniu białek, podobnie jak pozostałe części tego rozdziału zakończona jest krótkim podsumowaniem, pomocnym w śledzeniu przebiegu postępu realizacji projektu. Po uzyskaniu preparatów czterech endolizyn wykorzystano je w analizach aktywności przeciwbakteryjnej. Biorąc pod uwagę ilość przedstawionych testów należy tutaj docenić pracowitość Doktorantki. Pewne wątpliwości budzi nieco zawiły i trudny do zrozumienia opis przyjętej jednostki aktywności enzymatycznej endolizn. Uzyskane wyniki zilustrowane są licznymi wykresami, uchybieniem jest jednak brak odnośników do nich w tekście. Zasadniczym mankamentem tej części Wyników jest powtarzający się podobny opis rezultatów kolejno przeprowadzanych eksperymentów. Łatwiejsze w odbiorze dla czytelnika byłoby opisanie uzyskanych aktywności w sposób bardziej zbiorczy, pozwalający na uniknięcie powtarzających się fragmentów. Zebrane informacje znajdujemy niemniej jednak w zwięzłym podsumowaniu tej części Wyników. W ostatniej, najkrótszej części Wyników Doktorantka demonstrowa brak wpływu badanych białek na komórki ludzkie.

W Dyskusji Doktorantka rozważa przyczyny i sposoby rozwiązania problemów, które napotkane zostały podczas realizacji projektu doktorskiego. Poruszono też kilka ciekawych zagadnień, na przykład modyfikacje genomów faga chroniące przed systemem restrykcji. W Dyskusji zabrakło mi jednak szerszego odniesienia przewidywanych *in silico* aktywności enzymatycznych badanych białek do wyników uzyskanych w testach aktywności przeciwbakteryjnej dla poszczególnych gatunków bakterii. A zatem dodatkowe pytania, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy doktorskiej to: czy możliwa jest weryfikacja aktywności enzymatycznej wybranych enzymów w testach biochemicznych *in vitro*? Badania takie stanowiłyby ciekawe uzupełnienie informacji uzyskanych dzięki analizom *in silico* i testów aktywności przeciwbakteryjnej. A ponadto: co kierowało Doktorantką przy wyborze takich, a nie innych enzymów fagowych? Biorąc pod uwagę fakt, że endolizyny K11 i KP32 mają podobną strukturę domenową i znaczną homologię, czy można było oczekiwać odmiennych właściwości przeciwbakteryjnych?

W pracy powołano się na blisko 200 pozycji literaturowych, głównie najnowszych publikacji, co świadczy o doskonałym zorientowaniu Doktorantki w temacie badań.

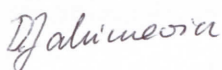
W rozprawie doktorskiej dostrzegłam kilka niefortunnych sformułowań czy skrótów myślowych np.

- tytuł rozprawy – sformułowanie „Klebsiella-specyficznych”,
- strona 66: „odcina zatem peptyd od łańcucha cukrowego w mureinie...” – można uznać za zbyt pochopny wniosek,
- strona 81 „siła peptydu sygnałnego” jest niepoprawnym sformułowaniem,
- strona 93 „nie otrzymano rezultatu nadekspresji białka” - ekspresja dotyczy genu.

Jeśli chodzi o formalną stronę pracy, to poza wymienionymi problemami w podpisach do rysunków, lub braku odnośników, pojawiają się także drobne błędy językowe i edytorskie, takie jak na przykład:

- opis rysunku 1 w języku angielskim,
- brak stężeń starterów w tabelce na str. 55,
- mało czytelny rysunek na stronie 67.

Pomimo wspomnianych uchybień uważam, że rozprawa mgr Barbary Maciejewskiej **spełnia wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Barbary Maciejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dagmara Jakimowicz