



Instytut Biochemii i Biofizyki Polska Akademia Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; Tel.: +48 22 / 592 21 45; Fax: +48 22 / 592 21 90; e-mail: sekretariat@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>

Prof. dr hab. Małgorzata Łobocka,
Pracownia Biologii Bakteriofagów,
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Ul. Pawińskiego 5A,
02-106 Warszawa,
Tel.: 022-592-1300 lub 022-592-1303,
E-mail: lobocka@ibb.waw.pl

Warszawa, 30. 09. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Majewskiej pt.:

**„Molekularne i immunologiczne uwarunkowania obecności bakteriofagów T4, A3R i 676Z
w jelicie myszy”**

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska (Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk, Wrocław)

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Joanny Majewskiej została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN (IIiTD PAN), we Wrocławiu, pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej. Dotyczy reakcji układu immunologicznego na bakteriofagi podawane do przewodu pokarmowego, oraz przystosowań do środowiska przewodu pokarmowego wykształconych w ewolucji przez przykładowego bakteriofaga infekującego bakterie jelitowe. Praca ma bezpośredni związek z badaniami nad terapeutycznym zastosowaniem bakteriofagów w leczeniu infekcji bakteryjnych prowadzonymi od lat w IIiTD. Jej temat i zakres wpisują się w tematykę badań zespołu pani promotor pracy, prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej zapoczątkowaną pod okiem prof. Andrzeja Górskiego w IIiTD PAN ponad 20 lat temu, kiedy jeszcze interakcji pomiędzy bakteriofagami, a układem immunologicznymi w większości renomowanych instytucji naukowych świata zachodniego w ogóle nie brano pod uwagę. Obecnie badania w tym zakresie są uznawane za kluczowe nie tylko dla zrozumienia interakcji bakteriofagów z bakteriami w zainfekowanym przez bakterie organizmie ale też dla wyznaczenia standardów efektywnego i bezpiecznego stosowania terapii fagowej w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Mimo, że włączyły się w nie inne ośrodki, zespół prof. Krystyny Dąbrowskiej jest jednym z wiodących w wyjaśnianiu

podłoża molekularnego tych interakcji.

Rozprawa mgr. Joanny Majewskiej opiera się na wynikach opublikowanych w trzech oryginalnych artykułach w renomowanych czasopismach ujętych w bazie danych Web of Science: *Viruses*, *Frontiers in Immunology* i *Microbiology Spectrum*, o łącznym współczynniku oddziaływania 13,0 (wg roku publikacji). Artykuły ukazały się w druku kolejno w latach 2015, 2019 i 2023. W skład rozprawy wchodzi czterostronnicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenia doktorantki oraz współautorów dotyczące udziału doktorantki w przygotowaniu publikacji wchodzących w skład rozprawy, publikacje oraz krótkie podsumowanie w języku angielskim zawierające najważniejsze wnioski z opisanych doświadczeń. Do rozprawy dołączony jest autoreferat w języku polskim składający się z krótkiego wprowadzenia, opisu celu pracy i zakresu przeprowadzonych w niej badań przedstawionego w formie spisu zagadnień poruszanych w każdej z publikacji, zbiorczego omówienia wyników, wniosków, spisu literatury oraz informacji o dorobku naukowym i karierze naukowej doktorantki. Publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały już ocenione przez specjalistów po ich wysłaniu do czasopism. Dodatkowo, wysoka wartość merytoryczna dwóch pierwszych, opublikowanych przed złożeniem rozprawy została potwierdzona dużą liczbą cytowań (99 i 33, wg danych z Web of Science z 30. 09. 2023). Chociaż wszystkie publikacje są wieloautorskie, mgr Majewska jest pierwszym autorem każdej z nich, a jej udział w tworzeniu każdej z publikacji był dominujący (50-77%), co zostało potwierdzone w zgodnych oświadczeniach współautorów.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej mgr Joanny Majewskiej są spójne tematycznie. Ich wspólnym celem była identyfikacja wybranych czynników immunologicznych i molekularnych wpływających na obecność i infekcyjność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym, w modelu mysim. Wybranymi do badań eksperymentalnych obiektami były trzy bezwzględnie lityczne bakteriofagi, modelowy bakteriofag T4 *Escherichia coli* występujący naturalnie w przewodzie pokarmowym człowieka oraz dwa blisko spokrewnione bakteriofagi gronkowcowe, A3R i 676Z. Wszystkie są bezwzględnie lityczne, mają duże genomy i reprezentują morfotyp myowirusów. Wszystkie wykorzystywane były zarówno w badaniach nad terapią fagową jak i w eksperymentalnych terapiach fagowych u ludzi w różnych ośrodkach na świecie, a bakteriofagi A3R i 676Z w Ośrodku Terapii Fagowej IIiTD PAN. Z tego względu wszystkie są obiektem zainteresowań zarówno w środowisku naukowym, jak i medycznym. W czterostronnicowym streszczeniu rozprawy, będącym jednocześnie wstępem do wchodzących w jej skład publikacji doktorantka uzasadniła stosowanie fagoterapii w leczeniu zakażeń bakteryjnych jako najbardziej perspektywicznej alternatywy dla antybiotykoterapii, w świetle narastającej oporności bakterii na antybiotyki. Przedstawiła też najczęstsze drogi podawania bakteriofagów

terapeutycznych, z podkreśleniem drogi podawania doustnego jako bezpiecznej, ale też związanej z niebezpieczeństwem inaktywacji bakteriofagów w przewodzie pokarmowym. Podkreśliła aspekt kluczowej roli bakteriofagów w utrzymaniu równowagi pomiędzy bakteriami przewodu pokarmowego wchodzącymi w skład mikrobiomu oraz krótko podsumowała wcześniejsze badania nad możliwościami indukcji odpowiedzi immunologicznej przez bakteriofagi, ze szczególnym uwzględnieniem specyfiki tej odpowiedzi przy po podaniu fagów drogą pokarmową.

W dalszej części doktorantka opisała badane bakteriofagi i ich wybrane białka elementy strukturalne. Poświęciła uwagę przede wszystkim białkom faga T4 eksponowanym na kontakt z układem immunologicznym człowieka lub zwierzęcia zainfekowanego przez bakterie będące gospodarzami tego faga.

W dwóch pierwszych publikacjach wchodzących w skład rozprawy zatytułowanych kolejno "Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood" oraz "Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os", zbadano zdolność bakteriofaga T4 (publikacja w *Viruses*) oraz bakteriofagów A3R i 676Z (publikacja we *Frontiers in Immunology*) podawanych myszom drogą pokarmową, do indukcji swoistych przeciwciał oraz trwałość uzyskanej odpowiedzi immunologicznej i jej wpływ na liczbę odzyskiwanych bakteriofagów. W obu pracach zastosowano podobny schemat doświadczeń. Po studniowym okresie podawania fagów stosowano podobnej długości przerwę, a następnie podawano fagi przez kolejn kilkadziesiąt dni. Równolegle od zwierząt otrzymujących fagi pobierano próbki kału i krwi, w celu pomiaru poziomu fagowo-specyficznych przeciwciał oraz liczebności bakteriofagów.

W badaniach nad bakteriofagiem T4 wykazano, że po około miesiącu ekspozycji na tego faga, we krwi myszy pojawiały się przeciwciała klasy IgG, a po ponad dwóch miesiącach przeciwciała klasy IgA. Poziom przeciwciał zależał od dawki podawanego faga. Przerwanie podawania faga skutkowało powolnym zanikiem przeciwciał klasy IgA, a ich ponowne podawanie powodowało szybszą indukcję produkcji specyficznych IgA niż podanie pierwotne. Praca ta jest pierwszym tak długotrwałym studium odpowiedzi immunologicznej na faga T4 podawanego drogą pokarmową. Najważniejszym i nowym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest wykazanie korelacji pomiędzy zmniejszającym się mianem faga odzyskiwanego w kale myszy, a zwiększającym się poziomem przeciwciał klasy IgA w przewodzie pokarmowym, a nie, w jak oczekiwano, pojawianiem się w kale klonów *E. coli* opornych na faga. Jednocześnie analizując frakcje przeciwciał anty-fagowych w surowicy myszy pojonych zawiesiną faga wykazano z wykorzystaniem oczyszczonych białek wirionu faga, że zarówno wśród przeciwciał klasy IgA jak i IgG dominują przeciwciała przeciwko białku Hoc dekorującemu kapsyd oraz białku gp12

tworzącemu haczyki płytki podstawnej, a pozostałe białka kapsydu są mniej immunogenne. Istotnym wnioskiem w odniesieniu do możliwości wykorzystania faga T4 w fagoterapii okazało się wykazanie, że po podawaniu drogą pokarmową fag ten jest kilkakrotnie mniej immunogenny, niż podawany drogą iniekcji podskórnej. W dalszych badaniach przedstawionych w pracy pokazano, że fag T4 prezentujący antygen wirusa Ebola w fuzji z białkiem Hoc, i podawany drogą pokarmową może indukować odpowiedź immunologiczną przeciwko temu antygenowi. Chociaż poziom uzyskanych przeciwciał był niewielki eksperyment ten wskazał na zasadność prac nad opracowaniem doustnie podawanych szczepionek z wykorzystaniem faga T4 jako nośnika antygeny.

W przedstawionych w drugiej publikacji badaniach immunogenności blisko spokrewnionych fagów gronkowcowych A3R i 676Z podawanych drogą pokarmową pokazano, że duża część konkluzji z badań nad immunogennością i trwałością odpowiedzi immunologicznej na faga T4 opisanych w pierwszej pracy, w tym czas pojawiania się przeciwciał klasy IgG i IgA w trakcie okresu podawania faga, czas ich zaniku po odstawieniu faga i szybsza indukcja po ponownym podaniu faga, a także korelacja pomiędzy wzrostem poziomu specyficznych IgA i spadkiem poziomu aktywnych fagów w kale ma charakter uniwersalny, chociaż fagi te w odróżnieniu od faga T4 indukowały też produkcję specyficznych przeciwciał klasy IgM. Wykazano zarówno pasaż podawanych bakteriofagów przez przewód pokarmowy myszy, mimo braku gospodarza tych fagów w jelicie jak i ich niewielką translokację z przewodu pokarmowego do krwi. Zidentyfikowano dwa białka wirionów, główne białko kapsydu i jedno z białek ogonka, jako odpowiedzialne za immunogenność fagów A3R i 676Z. Co więcej zademonstrowano, że fagi te nie mają wpływu na skład mikrobiomu zdrowych myszy. Podobnie jak w przypadku faga T4 wykazano, że indukcja odpowiedzi immunologicznej na fagi A3R i 676Z podawane drogą pokarmową jest istotnie niższa niż na te same fagi podawane drogą podskórnej iniekcji.

O ile dwie pierwsze publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mgr Joanny Majewskiej zogniskowane są na badaniach reakcji immunologicznej myszy na podawane drogą pokarmową fagi, trzecia publikacja pt. "Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors", która ukazała się w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*, poświęcona jest zbadaniu bezpośredniego wpływu czynników występujących w środowisku przewodu pokarmowego na aktywność fagów. Wykorzystanym jako przykład obiektem badań był fag T4. Celem pracy było określenie w jakim stopniu złożona aż z czterech głównych białek struktura kapsydu tego faga determinuje jego odporność na czynniki środowiska przewodu pokarmowego i jaka jest rola poszczególnych białek kapsydu w stabilności jego struktury w przewodzie pokarmowym. Na potrzeby realizacji opisanych w tej pracy badań skonstruowano fagi

T4 tworzące kapsyd pozbawiony jednego, dwóch lub nawet trzech jego białek, co samo w sobie było ambitnym i trudnym przedsięwzięciem, ze względu na konieczność konstrukcji podwójnych, potrójnych i poczwórnych mutantów faga T4 pozbawionych określonych białek kapsydu, a jednocześnie produkujących inne białka kapsydu w zmienionej formie, kompensującej ten brak. Poprzez porównanie miana infekcyjnych wirionów w preparatach uzyskanych fagów po ich ekspozycji na czynniki charakterystyczne dla środowiska przewodu pokarmowego, takie jak temperatura, niskie i wysokie pH, enzymy proteolityczne i sole żółci, wykazano, że białkami główki kluczowymi dla stabilności wirionu w przewodzie pokarmowym są główne białko główki gp24 i białko Sok spajające elementy główki. Poza osiągnięciem głównego celu pracy jej niespodziewanym i ważnym wynikiem jest pokazanie olbrzymiego zakresu tolerancji bakteriofaga T4 na zmiany w obrębie kapsydu, uważanego za zakonserwowaną w ewolucji część wirionu. Poszerza to zakres modyfikacji kapsydów fagowych uznawanych dotąd za możliwe i nie zaburzające infekcyjności fagów wykorzystywanych w terapii lub biotechnologii.

Wszystkie publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej wymagały wykorzystania różnorodnych metod mikrobiologii, immunologii, biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, a także specjalistycznego i dobrze wyposażonego laboratorium. Mimo, że liczba współautorów każdej z publikacji wynosi (w kolejności publikowania, 15, 13 i 9), dominujący udział procentowy mgr Joanny Majewskiej w ich przygotowaniu potwierdzony przez współautorów poparty jest listą zrealizowanych przez nią zadań. W przypadku pierwszych dwóch publikacji doktorantka oprócz udziału w planowaniu, analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu, wykonała dominującą część badań immunologicznych, łącznie z immunizacją lub nadzorowaniem immunizacji myszy, pobieraniem i analizą próbek, przygotowywała i oczyszczała fagi do badań, przygotowywała próbki mikrobiomu i analizowała ich skład, brała udział w produkcji i oczyszczaniu rekombinowanych białek. W przypadku trzeciej publikacji udział doktorantki polegał na planowaniu doświadczeń, analizie wyników i przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz wykonaniu m. in. ukierunkowanej mutagenezy fagów, konstrukcji plazmidów, produkcji i oczyszczaniu rekombinowanych białek, ocenie morfologii zmienionych wirionów na zdjęciach z mikroskopu elektronowego, zbadaniu wpływu różnych czynników na zachowanie infekcyjności skonstruowanych mutantów fagowych. Potwierdza to opanowanie przez doktorantkę metodologii wykorzystanej w realizacji jej badań.

Uwagi i zagadnienia do dyskusji

1) Jakie były przesłanki do zbadania mikrobioty przewodu pokarmowego myszy, po podaniu drogą

pokarmową bakteriofagów przeciwoonkologicznych, mimo, że wśród mikroorganizmów jelitowych badanych myszy nie stwierdzono bakterii wrażliwych na podawane fagi?

2) Czy są badania pokazujące odpowiedź układu immunologicznego człowieka na fagi lityczne podawane drogą pokarmową, a jeśli tak, to czy i jakie zbieżności otrzymano w ich wynikach w porównaniu z wynikami prac włączonych do ocenianej rozprawy?

3) Dlaczego do zawiesin fagów podawanych drogą pokarmową w celu immunizacji myszy nie dodawano środków zobojętniających sok żołądkowy. Na ile ich dodanie mogłoby zwiększyć liczbę fagów w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego i fagów przechodzących z jelita do krwi, i czy mogłoby to zwiększyć miano specyficznych przeciwciał antyfagowych w przewodzie pokarmowym?

4) W jaki sposób wyniki badań nad reakcją układu immunologicznego na fagi mogą zostać wykorzystane w planowaniu terapii antybakteryjnych z wykorzystaniem bakteriofagów?

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Joanny Majewskiej stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. 2017, poz. 1789) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Przedstawione w rozprawie wyniki badań wnoszą istotny wkład do wiedzy na temat odpowiedzi układu immunologicznego na podawane drogą pokarmową fagi i jego roli w eliminacji fagów z organizmu, a także na temat możliwego wpływu środowiska przewodu pokarmowego na kształtowanie struktury bytujących w nim bakteriofagów. Dlatego składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Joanny Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoką wartość merytoryczną prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Joanny Majewskiej oraz fakt zdobycia przez nią finansowania na część opisanych badań w ramach grantu otrzymanego w programie Preludium finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, wnioskuję do Rady Naukowej IIiTD PAN o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą. We wniosku tym utwierdza mnie dodatkowo analiza całokształtu osiągnięć naukowej doktorantki, który oprócz publikacji ujętych w rozprawie włącza współautorstwo 17 innych publikacji, zgłoszenia patentowe oraz szeregu komunikatów konferencyjnych.

M. Sobolewski