

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

9.10.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. **„Molekularne i immunologiczne uwarunkowania obecności bakteriofagów T4, A3R i 676Z w jelicie myszy”**

“Molecular and immunological determinants for T4, A3R and 676Z phages presence in mice gut”

Mgr Joanny Majewskiej

Rozprawa doktorska wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Przedstawiona do recenzji rozprawa opiera się na zbiorze trzech prac oryginalnych, wieloautorskich, w których Doktorantka jest pierwszą Autorką, a w jednej z prac także Autorką korespondencyjną. Wyniki, które są podstawą oceny w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w ministerialnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych: *Viruses* (obecnie IF=4,7); *Frontiers in Immunology* (obecnie IF=7,3) oraz *Microbiology Spectrum* (IF=3,7). Prace zostały opublikowane w latach: 2015-2023. Do dokumentacji rozprawy doktorskiej dołączone jest opracowanie (Autoreferat) zawierające rozdziały: *Wprowadzenie*, *Cel pracy i zakres badań*, *Omówienie wyników*, *Wnioski*, *Dorobek Naukowy* oraz *Bibliografię*. W samej rozprawie doktorskiej Autorka umieściła rozdziały: *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Listę publikacji*, *Deklaracje współautorów*, *Publikacje* oraz *Wnioski*. Do dokumentacji rozprawy doktorskiej dołączone są oświadczenia współautorów oraz Doktorantki. Należy tutaj zaznaczyć, iż oświadczenia są bardzo rozbudowane, szczegółowo opisany jest zakres udziału własnego współautorów prac. W oświadczeniach autorskich opis udziału własnego jest przedstawiony w formie opisowej, ale także w formie procentowej (%). Biorąc pod uwagę powyższe, przytaczam te dane, choć nie jestem zwolenniczką tak drobiazgowego, matematycznego podziału udziałów, przedstawianego w formie procentów. Uważam, że bardzo dobrze przygotowany opis udziału własnego (a taki został w dysertacji przez Doktorantkę



przygotowany), dodatkowo zaznaczony w tekście publikacji, jest wystarczającym do stwierdzenia wiodącej roli Doktorantki w danym typie i zakresie badań prowadzonych w zespole naukowym, kiedy są to prace wieloautorskie. Zatem w dokumentacji zaznaczono, iż wkład Doktorantki w opublikowane prace wynosi: 50% (praca *Viruses*, 2015), 60% (praca *Frontiers in Immunology*, 2019) oraz 77% (praca *Microbiology Spectrum*, 2023). Warto odnotować, że praca opublikowana w czasopiśmie *Viruses* jest już cytowana 99 razy, natomiast praca opublikowana we *Frontiers in Immunology* cytowana jest 33 razy. Podsumowując kwestie formalne stwierdzam, iż dokumentacja rozprawy doktorskiej zawiera wszystkie wymagane elementy i są one przygotowane bardzo dokładnie i szczegółowo.

Jak wskazuje Doktorantka, celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja wybranych czynników immunologicznych i molekularnych wpływających na obecność i aktywność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym, w modelu mysim. Praca powstała w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów, IITD PAN we Wrocławiu, ośrodkiem o światowej renomie, mogącym poszczycić się niekwestionowanymi osiągnięciami w zakresie m.in. terapii fagowej, badań nad budową molekularną wirionów fagowych czy farmakokinetyki bakteriofagów. Merytoryczną opiekę nad pracą doktorską sprawowała prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska posiadająca ogromne doświadczenie w tematyce pracy doktorskiej. Potwierdzeniem są bogata lista publikacji, a także fakt otrzymania finansowania badań z NCN (SONATA BIS 1 oraz OPUS 18) na badania objęte niniejszym doktoratem. Finansowanie na badania otrzymała także Doktorantka (PRELUDIUM 13). Praca w tak znamienitym zespole badawczym z pewnością miała ogromny wpływ na rozwój naukowy Doktorantki.

Tematykę podjętą w niniejszej dysertacji uważam za ważną i istotną nie tylko ze względu na badania podstawowe, ale także w odniesieniu do kwestii terapeutycznych. Biorąc pod uwagę nieustannie rosnące zagrożenie związane z antybiotykoopornością, już nie tylko szczepów klinicznych, ale także powszechnie bytujących w naszym otoczeniu i jednocześnie ogromne zainteresowanie badaczy poszukiwaniem alternatywnych metod zwalczania bakterii, tematykę przedstawionej do recenzji pracy uważam za bardzo aktualną, szczególnie odnosząc się do jej immunologicznych aspektów. We *Wprowadzeniu*, Autorka ogólnie odnosi się właśnie do zagadnienia antybiotykooporności, nazywając ją „cichą pandemią” z czym się absolutnie zgadzam.

- W związku z tym, iż mamy rok 2023, a w tekście Autorka odnosi się do danych z 2019 roku, moje pytanie dotyczy tego, czy mamy obecnie już bardziej aktualne dane dotyczące liczby zgonów na świecie, których przyczyną była oporność bakterii na antybiotyki?

Dane i informacje w tym zakresie, także bazujące na danych z lat poprzednich w pełni potwierdzają słuszność i celowość podejmowanych w tej pracy doktorskiej badań.

Doktorantka wskazując na prace innych autorów zaznacza, że preparaty fagowe mogą być podawane na wiele sposobów.

- Czy zatem, biorąc pod uwagę własne doświadczenia, nabyte podczas realizacji pracy doktorskiej, może Doktorantka wysunąć wnioski co do najbardziej skutecznych obecnie dróg podawania preparatów fagowych w terapii?

Jak słusznie zauważa Autorka pracy doktorskiej, bakteriofagi mogą indukować odpowiedź immunologiczną. W kontekście wcześniejszych doniesień o tym, że bakteriofagi mogą wykazywać działanie immunomodulacyjne oraz że pojawienie się przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów leczonych fagami nie wyklucza skuteczności terapii, badania Doktorantki nad indukcją odpowiedzi humoralnej przez bakteriofagi podawane drogą pokarmową wnoszą nowe, cenne dane. Cele pracy i zakres badań przedstawione są bardzo czytelnie i zostały w pełni zrealizowane.

W pierwszej pracy (*Viruses*, 2015), Doktorantka badała zdolność indukcji odpowiedzi humoralnej przez bakteriofagi podawane doustnie na przykładzie faga T4 (badania prowadzone w modelu mysim). W pracy tej badano także wpływ indukcji przeciwciał swoistych na aktywność faga T4 w przewodzie pokarmowym myszy oraz określono rolę białek strukturalnych bakteriofaga T4 w indukcji odpowiedzi humoralnej. Pod względem metodycznym Doktorantka samodzielnie przygotowywała m.in. lizaty faga T4, oczyszczała preparaty fagowe metodą powinowactwa LPS, nadzorowała i przeprowadzała doświadczenie immunizacji myszy preparatem faga T4. Do badań obecności fagów we krwi i kale zastosowała metody mikrobiologiczne, natomiast immunogenność wybranych białek strukturalnych faga badała z zastosowaniem metody ELISA. W opublikowanym manuskrypcie, Doktorantka była odpowiedzialna za planowanie doświadczeń, analizę uzyskanych wyników, w tym analizę statystyczną, przygotowywała ryciny oraz brała udział w jego przygotowywaniu. W pierwszej pracy dokonano bardzo interesujących obserwacji, w opinii Recenzentki kluczowym jest finalne wskazanie, iż w modelu doustnego podawania bakteriofagów, wiriony fagowe wykazują relatywnie słabą immunogenność. Jednocześnie w pracy pokazano, iż obecność w jelicie przeciwciał klasy IgA jest czynnikiem ograniczającym aktywność i występowanie fagów w jelitach. Bardzo innowacyjnym jest spojrzenie na to zagadnienie także od strony faga i jego białek strukturalnych. Interesującym wnioskiem, jaki wyciągnęła Doktorantka na bazie badań własnych oraz prac innych autorów, jest ten stwierdzający, iż za immunogenność białek strukturalnych fagów mogą być odpowiedzialne nie tylko właściwości molekularne białek, ale także droga



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

podania preparatów. W pierwszej pracy, ciekawym pomysłem Doktorantki jest zobrazowanie części wyników dotyczących immunogenności badanych białek faga poprzez pokazanie ich na rysunku faga i wykresie jednocześnie (Figura 3).

W odniesieniu do pierwszej pracy poproszę o odpowiedź na pytanie:

- Jak Doktorantka ocenia skuteczność oczyszczania preparatów fagowych z endotoksyny zastosowaną przez siebie metodą? Czy procedura wykonywana była jednokrotnie, czy wymagała powtórzeń?

Kolejne badania, zaprezentowane w drugiej, z cyklu prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opublikowane we *Frontiers in Immunology*, są ciekawą kontynuacją i rozszerzeniem wyników otrzymanych w pracy pierwszej (*Viruses*, 2015) i w opinii Recenzentki, wzmacniają i potwierdzają wyciągnięte wcześniej wnioski. W drugiej pracy celami było badanie zdolności indukcji odpowiedzi humoralnej przez fagi A3R oraz 676Z (fagi terapeutyczne) specyficzne wobec bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, podawane doustnie, oraz badanie translokacji aktywnych cząstek fagowych z przewodu pokarmowego do krwi, w modelu mysim. W pracy tej Doktorantka przygotowywała m.in. lizaty fagowe, dokonywała oczyszczania preparatów fagowych, przeprowadzała immunizację myszy preparatami bakteriofagów, badała we krwi i kale obecność fagów metodami mikrobiologicznymi, a metodą ELISA wykonała ocenę immunogenności białek strukturalnych faga, wykonała także analizę składu mikrobiomu metodą sekwencjonowania NGS. Postawione do realizacji w tej pracy cele uważam za bardzo ciekawe m.in. ze względu na poszerzenie zakresu badań o inne fagi niż tylko fag T4. W pracy wykazano, iż badane bakteriofagi A3R oraz 676Z indukowały wytwarzanie przeciwciał klasy IgA w jelitach oraz IgG, IgM oraz IgA we krwi. W pracy wykazano także, że IgA wytwarzane w jelitach są głównym czynnikiem ograniczającym przemieszczanie się fagów w przewodzie pokarmowym. Byłoby interesującym, aby obserwacje poczynione dla fagów A3R oraz 676Z, w zastosowanym modelu badawczym, poszerzyć w przyszłości o inne fagi, tym bardziej, że Doktorantka stwierdza, cytując: „(...) o ile ogólna kinetyka indukcji przeciwciał swoistych ma uniwersalny charakter, to rola poszczególnych białek strukturalnych we wzbudzaniu odpowiedzi humoralnej może znacząco różnić się u poszczególnych fagów”. W drugim artykule wchodzącym w cykl rozprawy doktorskiej chciałabym szczególnie wyróżnić sposób przygotowania dyskusji w publikacji.

W trzeciej pracy opublikowanej w *Microbiology Spectrum*, Autorka badała rolę białek gb24, Hoc i Soc bakteriofaga T4 w odporności wirionów na warunki środowiskowe, charakterystyczne dla przewodu pokarmowego (temperatura, pH, obecność żółci, aktywność enzymów trawiennych). Doktorantka badania przeprowadziła na skonstruowanym panelu mutantów faga T4. Wykonała mutagenezę ukierunkowaną bakteriofagów, wykazała się także znajomością



innych metod i technik, w tym mikroskopii TEM czy chromatografii powinowactwa. Ważny wniosek postawiony przez Doktorantkę, wskazuje na kluczową rolę białka gp24 faga T4, w odporności na warunki środowiska, w tym na jego wysoką stabilność termiczną. W pracy Autorka również pokusiła się o spojrzenie ewolucyjne na skład białkowy oraz strukturę kapsydu bakteriofaga T4, a ideę tę przedstawiła w publikacji na ciekawej rycinie.

Analizując metodykę opublikowanych prac oraz oświadczenia Autorki należy stwierdzić, iż Doktorantka realizując pracę doktorską wykazała się znajomością zaawansowanych metod mikrobiologicznych, immunologicznych, mikroskopii elektronowej oraz biologii molekularnej. Całość rozprawy doktorskiej napisana jest bardzo dobrze pod względem językowym, a redakcyjne opracowanie nie budzi zastrzeżeń. Wszystkie trzy artykuły, składające się na cykl pracy doktorskiej, stanowią logiczną całość, ich zakres badań oraz kolejność eksperymentów zostały dobrze przemyślane, co umożliwiło Doktorantce przeprowadzenie trafnych konkluzji oraz przedstawienie celnych wniosków z pracy. Doktorantka przedstawiła 8 wniosków z przeprowadzonych badań. Zabrakło mi w nich jednak dokładniejszych wniosków płynących z pracy opublikowanej *Frontiers in Immunology*, dotyczącej innych niż fag T4, badanych fagów.

- Chciałabym zapytać Doktorantkę, jakie widzi konkretne przełożenie swoich wyników dla medycznych zastosowań oraz jakie kolejne badania w tej tematyce, w opinii Doktorantki, powinny być kontynuowane.

W Autoreferacie, będącym częścią dokumentacji, Autorka przedstawiła swój dorobek naukowy, który jak na ten etap kariery, jest w mojej opinii doskonały. Doktorantka obecnie ma H-Index równy 10, natomiast liczba cytowań prac, których jest współautorką wynosi bez autocytowań 553. Mgr Joanna Majewska ma w swoim dorobku już 20 prac, w których jest pierwszą autorką lub współautorką. Jedna z prac, w której Doktorantka jest współautorką otrzymała prestiżowe wyróżnienie w konkursie im. Prof. K. Bassalika na najlepsze prace wykonane w polskim laboratorium. Doktorantka była także kierownikiem grantu PRELUDIUM oraz wykonawcą w 7 innych projektach badawczych. Na konferencjach Doktorantka prezentowała wyniki w formie wystąpień ustnych (4 konferencje międzynarodowe) oraz prezentacji plakatowych (11 konferencji, międzynarodowych i krajowych), była także współautorką innych wystąpień konferencyjnych oraz prezentacji plakatowych na konferencjach międzynarodowych. Doktorantka odbyła również dwa staże naukowe, a w swoim dorobku ma zgłoszenie patentowe pt. „Bakteriofagi nadające się do wytwarzania



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

szczepionek oraz sposób ich otrzymywania". Dodatkowo, co godne pochwały, angażowała się w popularyzację nauki wśród dzieci i młodzieży.

W konkluzji końcowej stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Joanny Majewskiej pt. **„Molekularne i immunologiczne uwarunkowania obecności bakteriofagów T4, A3R i 676Z w jelicie myszy”** spełnia wszelkie wymagania jakie stawia się pracom doktorskim i wnosi nowe, cenne dane do dyscypliny nauki biologiczne. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. 2017, poz. 1789)". Zwracam się także do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny prowadzonych badań oraz wagę uzyskanych wyników.

Gabriela Bugla-Płoskońska
KIEROWNIK
prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska