

2016 04. 15

15 kwietnia 2016

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Dariusza Nowickiego „Molekularne mechanizmy kontroli rozwoju bakteriofagów lambdoidalnych kodujących toksyny Shiga”.

Bakteriofagi, czyli wirusy bakteryjne, to najliczniej reprezentowane organizmy w biosferze. Od prawie 100 lat z bakteriofagami wiązane są nadzieje na ich skuteczne wykorzystanie w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, co wydawało się szczególnie ważne w erze przedantybiotykowej oraz obecnie, gdy w wielu zakażeniach zaczynają dominować szczepy bakteryjne odporne na większość, lub wszystkie stosowane dzisiaj antybiotyki. Z drugiej strony bakteriofagi to ważny element zmienności mikroorganizmów związany nie tylko z horyzontalnym transferem genów ale także z reorganizacją materiału genetycznego gospodarza. Niektóre bakteriofagi, w tym badane przez Doktoranta fagi Stx, pełnią niezwykle ważną funkcję w patogenności mikroorganizmów, a poznanie mechanizmów molekularnych związanych z ich cyklem litycznym czy lizogenicznym, a szczególnie z regulacją tych procesów, jest niezwykle ważne dla zrozumienia wirulencji ich gospodarzy. Znaczące sukcesy w zrozumieniu roli fagów Stx w wirulencji enterokrwotocznych szczepów *E. coli* są prezentowane w postaci doskonałych publikacji przez macierzystą jednostkę Doktoranta, w tym przez Panią promotor prof. dr hab. Agnieszkę Szalewską Pałasz.

Przedstawiona do recenzji praca stanowi zbiór bardzo spójnych tematycznie, czterech prac eksperymentalnych opublikowanych w uznanych czasopismach mikrobiologicznych takich jak: J. Bacteriol., AAC, Sci. Rep. oraz J. Gen. Virol. We wszystkich ww. pracach Doktorant jest pierwszym autorem a załączone oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do jego kluczowej roli w realizacji opisywanych badań. Prace eksperymentalne poprzedzone zostały odpowiednim streszczeniem w języku polskim i angielskim, wprowadzającym jednocześnie czytelnika w tematykę badań. W tej części pracy Doktorant opisuje między innymi błonowe białko BamA *E. coli* jako receptor fagów lambdoidalnych. Proszę Doktoranta o uzupełnienie informacji na ten temat. **Czy BamA to jedyny receptor u *E. coli* dla tej grupy fagów ? Czy**



białko BamA *E. coli* jako receptor fagów lambdoidalnych. Proszę Doktoranta o uzupełnienie informacji na ten temat. **Czy BamA to jedyny receptor u *E. coli* dla tej grupy fagów ? Czy funkcjonalne białko BamA jest niezbędne w przeżywalności *E. coli* ? Czy znane są mutanty *E. coli* zawierające zmutowaną formę genu *bamA*, odporne na infekcję fagami lambdoidalnymi ?**

W pierwszej z przedstawionych do oceny prac autorzy badali rolę odpowiedzi ścisłej w replikacji DNA i cyklu litycznym wirusów Stx. W badaniach wykorzystano 5 bakteriofagów należących do tej grupy oraz odpowiednie mutanty bakteryjne częściowo lub całkowicie defektywne w syntezie alarmonu głodu ppGpp. W części metodycznej pracy autorzy opisali prowadzoną każdorazowo przed właściwymi eksperymentami kontrolę fenotypu mutantów. **Prosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie pojęcia „second site suppressor mutant”, czy zjawisko to było związane z zastosowaniem szczepów noszących punktowe mutacje w genach *spoT* i *relA* oraz dlaczego nie zdecydowano się zastosować mutantów delecyjnych ?** Przedstawione w pracy wyniki jednoznacznie wykazały, że ppGpp hamuje rozwój lityczny bakteriofagów Stx oraz replikację fagowego DNA. Z drugiej strony cykl lizogeniczny badanych bakteriofagów nie został znacząco zaburzony w mutantach z defektywną odpowiedzią ścisłą. Autorzy zaobserwowali także, że fagi Stx są bardziej wrażliwe na niskie stężenia czterofosforanu guanozyny niż fag λ . Niezmiernie interesujące było zaproponowanie w dyskusji pracy wyjaśnienie molekularnego mechanizmu tego zjawiska. Najciekawszą obserwacją, mającą również znaczenie dla powstania kolejnych prac zamieszczonych w ramach rozprawy doktorskiej, było wykazanie z zastosowaniem układu reporterowego zawierającego gen *gfp* pod kontrolą promotora toksyny Stx, że badany alarmon głodu hamuje ekspresję z późnych promotorów fagowych, wskazując na możliwość obniżania poziomu toksyny Stx poprzez indukcję u bakterii odpowiedzi ścisłej.

Druga ze zbioru prac dotyczy identyfikacji izotiocyjanianu fenetylu jako inhibitora enterokrwotocznych szczepów *E. coli* hamującego wytwarzanie toksyny Shiga. Co więcej, autorzy zidentyfikowali mechanizm za pośrednictwem którego dochodzi do zahamowania wzrostu i ograniczenia ekspresji toksyny, wskazując, że związek ten indukuje odpowiedź ścisłą u *E. coli* poprzez głód aminokwasowy oddziałując z Arg i Gly. Identyfikacja mechanizmu działania izotiocyjanianu fenetylu była możliwa dzięki zastosowaniu zdefiniowanych mutantów *E. coli* pozbawionych funkcjonalnych białek SpoT i RelA. W pracy tej zaobserwowano, że



dodatek badanego związku do hodowli bakteryjnej nie tylko hamuje proces spontanicznej lizogenii fagów Stx, ale także 100 krotnie obniża ten proces po dodaniu induktora wywołującego odpowiedź typu SOS. Obserwacja ta może nieść niezwykle cenne aspekty aplikacyjne w kontekście obserwowanej indukcji SOS i następnie produkcji toksyny przez szczepy enterokrwotoczne w wyniku działania subinhibitorowych stężeń niektórych antybiotyków. Poczynione obserwacje nie tylko więc wskazywałyby na potencjalną możliwość zastosowania izotiocyanianu fenetylu w terapii zakażeń szczepami EHEC, ale również na możliwość ich stosowania osłonowo, wspólnie z antybiotykami wykazującymi silniejszy efekt bójeży. W tym aspekcie za bardzo ważne należy uznać wykorzystanie bakteryjnych lizatów pochodzących ze szczepów indukowanych MMC i traktowanych lub nie PEITC do badania ich toksycznego efektu w stosunku do linii komórkowych. Eksperyment ten jasno wykazał zależność pomiędzy obecnością PEITC a obniżoną toksycznością lizatów. Proszę Doktoranta o odpowiedź na następujące pytania wynikające z tej niezwykle interesującej pracy. **Czy określano częstość nabywania oporności na PEITC przez szczepy EHEC ? Czy fizjologiczny poziom aminokwasów w jelicie człowieka sprzyja, czy raczej utrudnia skuteczne działanie PEITC ? Czy deplecja aminokwasów z udziałem PEITC nie będzie wywoływała negatywnych procesów w tkankach gospodarza ? Czy biorąc pod uwagę przewód pokarmowy jako miejsce infekcji szczepami EHEC oraz mechanizm działania PEITC, ewentualny proces leczenia nie powinien również zawierać wytycznych co do optymalnej diety pacjenta ?**

Powyższe pytania dotyczą również kolejnej pracy opublikowanej w 2016 roku w Scientific Rep. W pracy tej autorzy oceniają skuteczność działania kolejnych pięciu izotiocyanianin, różniących się strukturą, jako związków hamujących wzrost szczepów EHEC przy jednoczesnej inhibicji wytwarzania toksyny Shiga. Oceniono efekt badanych związków na wzrost bakterii, na indukcję profagów, metabolizm aminokwasów, ekspresję toksyny Stx i związaną z tym toksyczność lizatów bakteryjnych oraz integralność błony cytoplazmatycznej bakterii. Wskazano najbardziej efektywnie działające związki oraz zidentyfikowano aminokwasy, które ulegają deplecji w obecności badanych związków. **W dyskusji pracy autorzy poddają w wątpliwość ewentualny wpływ różnic w strukturze badanych związków na deplecję różnych aminokwasów, jak inaczej Doktorant tłumaczyłby obserwowany efekt?**



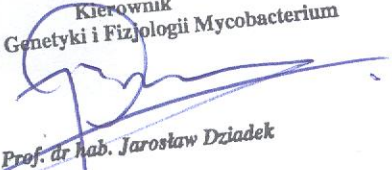
Niezwykle interesująca jest także ostatnia z przedstawionych prac opublikowana w 2015 w *Journal of General Virology*. Poprzez wykorzystanie defektywnego mutantu, poli(A) polimerazy, autorzy wykazali znaczenie poliadenylacji RNA dla cyklu litycznego i lizogenicznego bakteriofagów Stx i w mniejszym stopniu dla faga λ . Autorzy analizowali również poziom ekspresji genu *pcnB* obserwując jego znaczącą indukcję w obecności MMC wyłącznie w komórkach zawierających lizogenne fagi. Uzyskane wyniki jasno wskazały na udział procesu poliadenylacji RNA w regulacji rozwoju fagów Stx oraz zależność ekspresji poli(A) polimerazy od obecności profagów. W dyskusji pracy zaprezentowano bardzo przekonujące wyjaśnienie prawdopodobnego molekularnego mechanizmu związanego z zależnością pomiędzy obecnością funkcjonalnej poli(A) adenylazy a lizogenizacją fagów Stx. **Czy Doktorant mógłby natomiast spróbować wyjaśnić mechanizm związany z zależnością pomiędzy indukcją profagów i zwiększoną ekspresją *pcnB*, czego nie obserwowano w szczepach nielizogennych.**

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że w każdej z opublikowanych prac wchodzących w skład pracy doktorskiej Pana Dariusza Nowickiego dyskusja przeprowadzona jest w sposób bardzo profesjonalny, świadczący o świetnej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań. Na podkreślenie zasługuje także świetny warsztat badawczy Doktoranta, umiejętność doboru właściwych kontroli eksperymentów oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pana mgr Dariusza Nowickiego uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Dariusza Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na podjęte ryzyko naukowe, uzyskane niezwykle cenne wyniki poznawcze oraz jakość naukową ocenianej pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pana Dariusza Nowickiego przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek