

wpz. 4.11.2019 l. re



WYDZIAŁ BIOLOGII  
I OCHRONY  
ŚRODOWISKA  
Uniwersytet Łódzki

Zakład Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Prof. dr hab. Antoni Różalski

### Recenzja

### rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Dydeckiej

Tytuł rozprawy: „Rola genów i otwartych ramek odczytu zlokalizowanych w rejonie *exo-xis* fagów lambdoidalnych w rozwoju tych fagów”

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Dydeckiej została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod opieką Promotor dr hab. Alicji Węgrzyn, prof. IBB PAN i Promotor pomocniczej dr Bożeny Nejman-Faleńczyk. Mgr A. Dydecka w pracy doktorskiej zajęła się fagami przenoszącymi geny toksyn Shiga. Występują one w bakteriach enterokrwotocznych *Escherichia coli* (EHEC – Enterohemorrhagic *E.coli*) w formie profagów. Szczepy te uwalniają toksynę Shiga po indukcji profaga w trakcie jego cyklu litycznego. Działanie toksyny stanowi przede wszystkim zagrożenie dla dzieci i osób starszych, szczególnie pacjentów z zespołem hemolityczno-mocznicowym wywoływanym EHEC. Głównym rezerwuarem EHEC jest bydło, a wydaliny zwierząt stanowią źródło zanieczyszczenia wody, owoców czy warzyw, skąd bakterie przenoszone są do ludzi. Dwie epidemie zakażeń enterokrwotocznymi *E. coli* w 1996 r. w Japonii i w 2011 r. w Niemczech, skala zakażeń i przypadków śmiertelnych potwierdziły, iż szczepy te są groźne, a ich występowanie ma zasięg globalny. Należy więc podkreślić

znaczenie podjętych badań mechanizmów zaangażowanych w działanie fagów Stx dla szerszego zrozumienia podstaw chorobotwórczości EHEC.

Fagi Stx wykazują duże podobieństwo do faga  $\lambda$ . Charakteryzują się dwoma ścieżkami rozwoju – cyklem litycznym i cyklem lizogenicznym, a wybór jednej lub drugiej zależy od stanu fizjologicznego komórki gospodarza. Cykl lityczny pozwala fagom namnożyć się w komórkach bakterii. Droga ta prowadzi też do wytworzenia dużej ilości toksyny Shiga. W fazie lizogenicznej genom faga jest zintegrowany z genomem bakterii i występuje tam w formie profaga. Na skutek indukcji powodowanej różnymi czynnikami, w tym zewnętrznymi, dochodzi do jego uwolnienia i przejścia z cyklu lizogenicznego do litycznego. Mechanizmy związane z wyborem drogi rozwoju faga są stosunkowo dobrze poznane u faga  $\lambda$ , choć regulacja tych procesów wymaga dalszych badań. Odnosi się to także do fagów Stx, u których mechanizmy zawiadujące wyborem cyklu rozwojowego litycznego lub lizogenicznego, nie są w szczególności poznane, w tym zjawiska regulacji tych procesów. Ich lepsze poznanie i zrozumienie pozwoli na głębsze wyjaśnienie patogenezy zakażeń EHEC.

Mgr A. Dydecka włączyła się w prace zespołu badawczego fagów w Katedrze Biologii Molekularnej UG., który wykazał, iż w regionie *exo* i *xis* genomu fagów Stx leżą geny kodujące produkty zaangażowane w rozwój lityczny tych fagów. Doktorantka podjęła więc badania funkcji poszczególnych ramek odczytu i genów z rejonu *exo-xis*, mając też na uwadze fakt, iż tylko jeden gen z tego rejonu *ea8.5* został scharakteryzowany. W badaniach mgr A. Dydecka zastosowała metodę polegającą na konstrukcji fagowych mutantów delecyjnych pozbawionych sekwencji całego rejonu, jak i poszczególnych otwartych ramek odczytu. Celem szczegółowym tych badań było ustalenie znaczenia wybranych elementów genetycznych rejonu *exo-xis* dla rozwoju faga  $\lambda$  jako wirusa modelowego i faga  $\Phi 24_B$  przedstawiciela fagów Stx.

Rozprawa doktorska mgr A. Dydeckiej składa się z trzech współautorskich prac doświadczalnych już opublikowanych w latach 2016-2018, w czasopismach indeksowanych w szerokim międzynarodowym zasięgu: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (IF 4,868; pkt. MNSW 30), *Frontiers in Microbiology* (IF 4,019; pkt. MNSW 35) oraz *Viruses* (IF 3,811; pkt. MNSW 30). Do tych trzech prac dołączono oświadczenia współautorów o ich udziale w badaniach i przygotowaniu publikacji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Udział Doktorantki w badaniach i publikacjach jest dominujący. Brała udział w planowaniu doświadczeń, ich wykonywaniu, opracowywaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Oświadczenia Doktorantki i innych współautorów, wskazują na konkretne przedsięwzięcia jakich się podjęli w trakcie badań i przygotowania kolejnych publikacji. Były to działania o charakterze cząstkowym, takie jak wykonanie konkretnych oznaczeń, czy analiz oraz udział w przygotowaniu projektu, analizie wyników, czy też przygotowania manuskryptu.

W pierwszej pracy oryginalnej zbioru składającego się na rozprawę (Licznarska K., Dydecka A. i wsp. The role of the *exo-xis* region in oxidative stress mediated induction of Shiga toxin converting prophages. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 84533135) dokonano delecji regionu *exo-xis* lub jego fragmentu po indukcji profaga, po zadziałaniu nadtlutkiem wodoru lub promieniowaniem UV. Wykazano, iż delecja tego regionu z genomu faga  $\Phi 24_B$  powoduje znaczące upośledzenie zjawiska indukcji profaga z komórki *E. coli*, ale tylko w przypadku wymuszenia procesu po zadziałaniu nadtlutku wodoru. Nie zaobserwowano takiego efektu po zadziałaniu UV. Poziom indukcji uzyskanej za pomocą nadtlutku wodoru odpowiada poziomowi indukcji spontanicznej. Ponadto stwierdzono, iż delecja regionu *exo-xis* faga  $\lambda$  powoduje tylko nieznaczne opóźnienie indukcji wywołanej nadtlutkiem wodoru. Wykazano także, iż usunięcie regionu *exo-xis* z genomu faga  $\Phi 24_B$  powoduje obniżenie poziomu ekspresji fagowych genów regulatorowych i

genów bakterii biorących udział w odpowiedzi S.O.S. Ta obserwacja odnosi się do obu badanych fagów  $\lambda$  i  $\Phi24_B$ . Inny efekt wywołało usunięcie z genomu obu fagów poszczególnych otwartych ramek odczytu, lub genów zlokalizowanych w rejonie *exo-xis*. Te badania przyniosły odmienne wyniki w odniesieniu do różnych fagów. Stwierdzono opóźnienie zjawiska wymuszonej nadtlaniem wodoru indukcji, ale tylko profaga  $\Phi24_B$ . Drugi czynnik stymulujący - promieniowanie UV, nie powoduje takiego efektu. Doktorantka po analizie tych wyników mogła wnioskować, iż produkty genów rejonu *exo-xis* odgrywają rolę w indukowanej nadtlaniem wodoru odpowiedzi S.O.S. Biorąc to pod uwagę, podjęła się charakterystyki wybranych otwartych ramek odczytu z tego rejonu genomu badanych fagów. Wybrała trzy kolejne *orf60a*, *orf63* i *orf61*, znajdujące się na początku rejonu *exo-xis*.

W drugiej pracy doświadczalnej zbioru stanowiącego rozprawę doktorską (Dydecka A. i wsp. Bad phages in good bacteria: role of the mysterious *orf63* of  $\lambda$  and Shiga toxin-converting  $\Phi24_B$  bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8:1618) skoncentrowano się na analizie *orf63*. Wykazano, iż jest to funkcjonalny gen kodujący małe białko zawierające struktury  $\alpha$ -helikalne. Stwierdzono, że delecja tej sekwencji ma wpływ na zjawisko wymuszonej nadtlaniem wodoru indukcji obu badanych fagów  $\Phi24_B$  i  $\lambda$ . Przejawia się to obniżeniem wydajności cyklu litycznego, a w przypadku faga  $\Phi24_B$  także opóźnieniem czasu uwolnienia pierwszych potomnych cząstek fagowych. Wyniki te wskazały na znaczący wpływ białka Orf63 na wydajność indukcji profaga. Potwierdzono je w doświadczeniach komplementacji, ale tylko dla faga  $\lambda$ . Wykazano także, iż usunięcie *orf63* z genów obu badanych fagów spowodowało wzrost wydajności zjawiska lizogenizacji. W pracy, w dyskusji uwzględniono obserwacje innych badaczy, którzy wykazali, iż białko Orf63 oddziałuje z białkiem YghC, czynnikiem transkrypcyjnym, warunkującym wytwarzania enzymu YghD, odpowiedzialnego za obniżenie w komórce w warunkach stresu oksydacyjnego reaktywnych form tlenu. Doktorantka i

współautorzy publikacji przedstawili w pracy w formie modelu możliwą rolę białka Orf63, pokazując iż hamuje aktywność białko YghC i pośrednio YghD, co skutkuje wzrostem w komórkach poziomu reaktywnych form tlenu i uruchomieniem odpowiedzi S.O.S., co powoduje rozwój faga w cyklu litycznym.

W doświadczalnej pracy 3 doktoratu (Dydecka A. i wsp. Roles of *orf60a* and *orf61* in development of bacteriophages  $\lambda$  and  $\Phi24_B$ . Viruses. 2018. 10 (10):553) Doktorantka zajęła się otwartymi ramkami odczytu *orf60a* i *orf61*. Ich usunięcie z sekwencji genomu faga  $\Phi24_B$  wywołuje opóźnienie indukcji profaga, co też skutkuje niższą wydajnością cyklu litycznego, kiedy jako czynnika stymulującego to zjawisko użyto nadtlenu wodoru. Efekt ten był silniej zaznaczony w przypadku faga  $\Phi24_B$ . Doktorantka wykazała też, iż produkty kodowane przez sekwencje *orf60a* i *orf61* są istotne podczas tworzenia wirionów fagowych, a brak tych produktów skutkuje powstawaniem wirionów niezdolnych do skutecznej adsorpcji do komórek gospodarza. Autorzy pracy wskazali też na możliwa rolę regulacyjną, jaką mogą odgrywać ww. produkty podczas wyboru cyklu rozwojowego fagów litycznego lub lizogenego.

Podsumowując Mgr A. Dydecka zrealizowała postawione cele pracy doktorskiej. Uzyskane przez nią wyniki badań są oryginalne i nowatorskie. Zasługują na uznanie oraz wysoką ocenę. Rezultaty tych badań znacząco rozszerzyły naszą wiedzę o fagach lambdoidalnych niosących geny toksyn Shiga, a przede wszystkim przyczyniły się do wyjaśnienia nieznanych dotychczas funkcji genów rejonu *exo-xis* fagów  $\lambda$  i  $\Phi24_B$ . Jak przypuszczano, rejon ten koduje produkty ważne w regulacji rozwoju fagów, w szczególności podczas wyboru drogi rozwoju litycznej lub lizogennej. Doktorantka wykazała, iż trzy otwarte ramki odczytu *orf63*, *orf61* i *orf60a* kodują produkty istotne w cyklu litycznym fagów. Ważnym jej dokonaniem było też wykazanie, iż pomimo podobieństw badane fagi  $\lambda$  i  $\Phi24_B$  różnią się, a wiedza zdobytej w

badaniach modelowego faga  $\lambda$  powinna być weryfikowana eksperymentalnie, kiedy analizujemy inne fagi tej rodziny.

Warte podkreślenie jest też kompleksowe podejście w pracy do wyjaśniania postawionych zagadnień, zastosowanie różnych metod oraz technik genetycznych i molekularnych, co dało bardzo dobre efekty i przyczyniło się do tego, iż wyniki badań i wnioski są bardzo dobrze udokumentowane. Postawiono ambitne cele badań, ich realizacja mogła być możliwa w doświadczonym zespole naukowym. Doktorantka wykorzystała stworzone warunki, uzyskując ważne, znaczące wyniki, na co wskazują opublikowane wraz z współautorami prace. Wyniki badań, zostały więc już ocenione przez wymagających recenzentów. Ja nie mam uwag do przedstawionych w rozprawie wyników i ich oceny. Nieliczne potknięcia językowe w streszczeniu polskim zaznaczyłem w otrzymanym egzemplarzu. Pytanie jakie kieruję do Doktorantki dotyczą próby uzyskania w czystej postaci białek Orf60a i Orf61. Zapewne są kontynuowane, jeśli tak to czy je wyosobniono i czy ich wykorzystanie w badaniach potwierdziło uzyskane w pracy dane. Mgr A. Dydecka w końcowej części opisu wyników (str. 12-13) wskazuje na potencjalnie praktyczne znaczenie wyników jej badań fagów Stx, sugerując iż mogą przyczynić się do zidentyfikowania nowych celów molekularnych, możliwych do wykorzystania w terapii infekcji enterokrwotocznymi szczepami *E. coli*. Bardzo proszę o rozwinięcie tego zagadnienia podczas obrony i wskazanie alternatywnych dróg terapii zakażeń EHEC.

Praca była finansowana z kilku źródeł, w tym dwóch grantów Opus NCN, grantu dla Młodych Naukowców oraz w ramach Programu Rozwoju UG w obszarach Europa 2020, finansowanego przez UE. Doktorantka otrzymała w roku 2016/2017 stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia oraz nagrodę Rektora UG za rok akademicki 2014/2015. Mgr A. Dydecka legitymuje się dużym dorobkiem naukowym. Oprócz 3 prac zaliczonych do rozprawy doktorskiej jest współautorką 8 publikacji oraz 4

komunikatów na konferencjach naukowych. Kierowała grantem dla młodych badawczy.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Aleksandry Dydeckiej pt. „Rola genów i otwartych ramek odczytu zlokalizowanych w rejonie *exo-xis* fagów lambdoidalnych w rozwoju tych fagów” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnieniem niech będą przedstawione wyżej przeze mnie:

1. znaczenie wyboru problemu badawczego,
2. uzyskanie przez Doktorantkę oryginalnych, nowatorskich wyników badań,
3. opublikowanie tych wyników w czasopiśmie o międzynarodowym zakresie oddziaływania.

Łódź, 29.10.2019 r.

A. Nojalska