

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Zakład Genetyki Drobnoustrojów

Prof. dr hab. Adam Jaworski
Kierownik Zakładu

Łódź, 2012. 04. 11

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk, zatytułowana „Kontrola replikacji fagów lamblidalnych niosących geny toksyn Shiga w świetle potencjalnych, nowych metod ich wykrywania i terapii zakażeń enterokrwiotocznymi szczepami *Escherichia coli*”

1. Temat i cele pracy doktorskiej

Temat i cele pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk mieszczą się w jednym z głównych kierunków wieloletnich i bardzo owocnych poszukiwań naukowych prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna i Jego współpracowników z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego, dotyczącym czynników i mechanizmów regulujących proces replikacji DNA bakterii i bakteriofagów w warunkach różnych stresów środowiskowych. Doktorantka podjęła bowiem w swojej pracy ważne i trudne badania patogennych bakterii *Escherichia coli* produkujących toksynę Shiga (STEC), z których najbardziej chorobotwórcze są enterohemolityczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC), a znanym z niedawnej epidemii w Niemczech przedstawicielem tej grupy jest szczep *Escherichia coli* 0157:H7. Głównym czynnikiem wirulencji bakterii STEC są toksyny Shiga, kodowane przez geny *stx1* i *stx2* zlokalizowane w genomach bakteriofagów obecnych w genomach bakterii w postaci profagów, zaliczanych do grupy bakteriofagów lamblidalnych z racji ich podobieństwa morfologicznego oraz organizacji genomu faga λ . Co niezwykle ważne, w stadium lizogenii synteza toksyny Shiga, kodowanej przez geny *stx1* i *stx2* profaga jest zahamowana. Indukcja profagów czynnikami środowiskowymi prowadzi zaś do uruchomienia cyklu litycznego i w konsekwencji efektywnej syntezy toksyny Shiga.

Celem pracy mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk było poznanie i wyjaśnienie mechanizmu regulacji replikacji DNA fagów niosących geny *stx*, w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne, w tym w odpowiedzi na głodzenie aminokwasowe. Celem podjętych badań poznawczych było poznanie mechanizmów replikacji DNA tych lamblidalnych fagów i porównanie uzyskanej na ten temat wiedzy z dobrze poznanymi mechanizmami regulacji replikacji DNA faga λ . Dodam od siebie, że wkład Zespołu prof. dr hab. Węgrzyna w zrozumienie mechanizmów regulacji replikacji DNA faga λ w warunkach różnych stresów, zarówno podczas odpowiedzi ściślej jak i rozluźnionej, jest bardzo znaczący i dobrze udokumentowany w literaturze światowej. Założono, że obok mechanizmów regulujących proces indukcji lamblidalnych fagów noszących geny *stx*, sama efektywność replikacji materiału genetycznego tych fagów może mieć istotny wpływ na liczbę ich kopii w komórce gospodarza, co może mieć pierwszorzędne znaczenie w regulacji poziomu syntezy toksyn Shiga, determinujących w konsekwencji patogenność bakterii i przebieg infekcji. Z treści zamieszczonego w dysertacji Streszczenia jak i analizy wyników opublikowanych prac wynika również, że kierunkowym celem pracy doktorskiej było, jak pisze Doktorantka, „wskazanie potencjalnych zastosowań praktycznych uzyskanej nowej wiedzy”. Należy dodać w tym miejscu, że tak szczegółowe badania mechanizmu replikacji plazmidów lamblidalnych kodujących

syntezę toksyn Shiga zostały po raz pierwszy podjęte i z sukcesem zrealizowane w ramach pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk.

Praca doktorska mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk ma postać zbioru trzech opublikowanych zespołowych prac doświadczalnych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, poprzedzonego zwartym 5-stronicowym *Streszczeniem*, opracowanym zarówno w języku polskim jak i angielskim. Istotną część pracy stanowią jednoznaczne oświadczenia wszystkich współautorów tych prac o ich rzeczywistym wkładzie w ich realizację, ze wskazaniem konkretnych doświadczeń lub innych działań wspomagających. Analiza tych oświadczeń oraz fakt, że mgr Bożena Nejman - Faleńczyk jest pierwszym autorem tych trzech opublikowanych prac upoważnia mnie do stwierdzenia, że Jej wkład w ich realizację na wszystkich etapach był dominujący.

Wyniki

Nie dostrzegam żadnej przyczyny, która uzasadniałaby potrzebę opracowania recenzji pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk w sposób tradycyjny, z oceną części teoretycznej pracy, oceną zastosowanych materiałów, metod i technik badawczych, czy też oceny wartości uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w dyskusji pracy. Doktorantka przygotowała bowiem dysertację doktorską zgodnie z nowymi, pożądanymi przez środowisko naukowe zasadami, zgodnymi z obowiązującą obecnie w Polsce Ustawą o Stopniach i Tytułach Naukowych.

Uważam, że najważniejszym rezultatem podjętych badań, przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zgodnie ze współczesną „sztuką badawczą” w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki bakterii i bakteriofagów, są trzy prace opublikowane w „rankingowych”, specjalistycznych czasopiśmie naukowych świata: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009; *Microbiology*, 2011 i *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, których współczynnik oddziaływania IF wynosi, odpowiednio, **2, 648; 2, 957; 2, 134**, zaś sumaryczny IF tych trzech opublikowanych prac, wchodzących w skład pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk, wynosi **7, 739**. Zważywszy, że takie znaczące rezultaty naukowe zostały uzyskane w czasie Jej 4-letnich Studiów Doktoranckich - zasługuje na szczególne uznanie i stosowne wyróżnienie.

W tej sytuacji recenzent czuje się zwolniony ze szczegółowej oceny wszystkich wyników, opisanych w opublikowanych trzech pracach doświadczalnych, bowiem wyniki te podlegały skrupulatnej i surowej ocenie przez uznanych specjalistów, recenzentów i wydawców wyżej wspomnianych czasopiśmie naukowych. Recenzent jest jednak człowiekiem ciekawym, od lat śledzi wyniki prac publikowanych przez pracowników naukowych i Doktorantów, pracujących w Zespole prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Stąd, dość szczegółowo zapoznałem się także z wynikami opisanymi w pracach doświadczalnych wchodzących w skład pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk. Nie będę jednak wartościował uzyskanych wyników, natomiast pozwolę sobie skomentować z jednej strony jedynie te rezultaty, które mnie najbardziej zainteresowały z racji „sprytnej” metodyki zastosowanej dla ich uzyskania, z drugiej zaś te wyniki poznawcze, które mogą przełożyć się na praktyczne zalecenia dotyczące sposobów farmakologicznego leczenia infekcji bakteriami *E. coli* produkującymi toksyny Shiga.

Moim zdaniem, „kluczem” dla powodzenia realizowanego projektu było skonstruowanie sześciu lamdooidalnych plazmidów replikacyjnych z genami *stx*, analogicznych do plazmidu λ (pCB104), zawierających region *ori* bakteriofaga jako jedyne miejsce ich replikacji oraz geny i sekwencje regulatorowe niezbędne do replikacji plazmidowego DNA. Skonstruowane lambloidalne plazmidy, noszące geny kodujące syntezę toksyn Shiga, okazały się bardzo dogodnymi modelami, bowiem transformowane do komórek *E. coli* były stabilnie utrzymywane w kolejnych generacjach komórek gospodarza. Stąd, można było przeprowadzić serię dobrze zaplanowanych doświadczeń, wobec kontroli jaką był plazmid λ (pCB104), mających na celu wyjaśnienie i zrozumienie podobieństw i różnic w regulacji mechanizmu replikacji ich DNA. Wyniki na ten temat, świetnie udokumentowane w pracy opublikowanej w *Journal of Molecular*

Microbiology and Biotechnology (2009) dowodzą, że ogólny mechanizm replikacji DNA faga λ oraz skonstruowanych plazmidów lamdoidalnych, kodujących toksyny Shiga, jest bardzo podobny, aczkolwiek istnieją istotne różnice. Do takich różnic należy zaliczyć zdolność niektórych z nich do replikacji w gospodarzu niezdolnym do produkcji białka DnaA, które w przypadku faga λ jest konieczne dla efektywnej aktywacji z promotora pR regionu *ori*. Druga ujawniona przez Doktorantkę różnica dotyczy białka DksA, które obok ppGpp stanowi główny regulator transkrypcji w warunkach głodowych. W porównaniu z fagiem λ , białko DksA, wykazuje, jak się okazało, ograniczoną zdolność pozytywnej regulacji procesu transkrypcji z promotorów pR skonstruowanych plazmidów lamdoidalnych noszących geny *stx*.

Bardzo ważne wyniki, o implikacjach klinicznych, opisano w pracach opublikowanych w *Microbiology* (2011) oraz *Foodborne Pathogenesis and Disease* (2012). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, po pierwsze, że w warunkach głodzenia aminokwasowego (w odróżnieniu od plazmidu λ zachodzi silne hamowanie replikacji DNA skonstruowanych plazmidów lamdoidalnych noszących geny kodujące syntezę toksyn Shiga. Takie hamowanie obserwowane zarówno w warunkach odpowiedzi ścisłej jak i rozluźnionej. Po drugie, wykazano, że cytrynian sodu, składnik płynów nawadniających stosowanych w przypadku biegunek, podobnie jak głodzenie aminokwasowe, hamuje rozwój fagów lamdoidalnych kodujących syntezę toksyn Shiga na poziomie indukcji cyklu litycznego, hamowania replikacji ich DNA lub hamowania obu procesów równocześnie. Należy w tym miejscu dodać, że obserwacja, iż obecność glukozy odwraca efekt hamowania replikacji DNA badanych fagów lamdoidalnych z genami *stx*, może mieć istotne implikacje praktyczne dla opracowania nowych procedur związanych ze stosowaniem płynów nawadniających w przypadkach infekcji bakteriami *Escherichia coli* z grupy (EHEC). Ważną informacją, powiem wskazówką dla lekarzy, jest także inne przesłanie specjalistów opisane w ocenianej pracy doktorskiej. W świetle cytowanych prac oraz bogatego doświadczenia Zespołu prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna w dziedzinie badań poznawczych bakteriofagów, szczególnie doceniam przesłanie zawarte w ocenianej pracy doktorskiej, by nie stosować w leczeniu tych infekcji takich antybiotyków i sulfonamidów, które indukują bakteryjny system SOS, a tym samym indukują cykl lityczny profagów noszących geny kodujące toksyny Shiga, bowiem w efekcie zwiększają ekspresję toksyn około 100 razy. W tej sytuacji, w pełni podzielam także inną, moim zdaniem bardzo ważną rekomendację dla lekarzy, która jest zawarta w pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman- Faleńczyk, że prawidłowa, szybka i pewna diagnostyka przypadków infekcji bakteriami *E. coli* z grupy STEC jest kluczem dla wdrażania właściwej, bezpiecznej farmakologicznej terapii zakażonych pacjentów.

Wnioski końcowe

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk, w tym szczególnie wartości oryginalnych, opublikowanych wyników oraz ważnych wniosków o charakterze poznawczym i aplikacyjnym stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia pracy doktorskiej mgr Bożeny Nejman - Faleńczyk z uwagi na rangę przeprowadzonych badań oraz wysoką wartość uzyskanych wyników, w tym nowych, oryginalnych wyników o charakterze poznawczym, które zostały upowszechnione w postaci trzech publikacji w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych.

KIEROWNIK
ZAKŁADU GENETYKI DROBNOSTROJOWEJ

prof. dr hab. Adam Jaworski