



Dr hab. Izabela Kern-Zdanowicz

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Adolfa Pawińskiego 5a,  
02-106 Warszawa,  
tel.: (+48) 22592 1206  
e-mail: iza@ibb.waw.pl

Warszawa, 17.05.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej**

**pt.: „Izolacja i analiza nowych bakteriofagów *Bacillus anthracis* oraz charakterystyka funkcjonalna kodowanych przez nie endolizyn”**

**wykonana w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii (WIHE) im. Gen. Karola Kaczkowskiego w Ośrodku Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych pod kierunkiem prof. Małgorzaty Łobockiej z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i promotorki pomocniczej dr Lidii Mizak z WIHE.**

*B. anthracis*, jest tlenową Gram-dodatnią laseczką, wywołującą węglik, czyli chorobę, która może zostać przeniesiona na ludzi i, gdy nieleczona powoduje poważne konsekwencje dla zdrowia, a nawet może być śmiertelna. Bakteria ta, jak inni przedstawiciele rodzaju *Bacillus*, ma zdolność wytwarzania spor i przez to jest potencjalnym czynnikiem broni biologicznej. W 2001 roku w Stanach Zjednoczonych w wyniku ataków bioterrorystycznych zostało zakażonych węglikiem 11 osób, a finalnie zmarło 5 osób. Istotnym jest zatem znalezienie sposobu szybkiej i skutecznej interwencji w wypadku rozprzestrzeniania się spor *B. anthracis* oraz skutecznej metody leczenia zakażenia tym gatunkiem bakterii. W ostatnich kilkudziesięciu latach, wobec narastającego w świecie problemu oporności bakterii, w tym także bakterii patogennych, na dostępne środki przeciwbakteryjne, poszukuje się alternatywnych metod terapii zakażeń. Wśród nich w jest powrót zainteresowania terapiami opartymi o wirusy bakterii czyli bakteriofagi. Przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej wpisuje się doskonale w ten nurt. Zatem biorąc pod uwagę istotność zagadnień dotyczących możliwości terapeutycznych infekcji bakteriami patogennymi oraz potencjalną możliwość wykorzystania wyników tego typu badań w praktyce, nie ulega dla mnie wątpliwości, że wybór, zarówno tematyki badań jak i obiektu badawczego, był trafny i w pełni uzasadniony.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy ona 156 stron i została opatrzona 37 rycinami, 10 tabelami i zawiera 6 załączników. Rozprawa ma klasyczny układ, typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym, zawiera więc charakterystyczne dla takich opracowań rozdziały, tj. Streszczenie (również w języku angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję i Bibliografię. W osobnych rozdziałach zostały wyróżnione Zadania badawcze. W końcowej części sformułowano Podsumowanie i Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, a także zawarto informację o Upowszechnianiu wyników i finansowaniu badań. Z recenzenckiego obowiązku zauważam, że Autorka nie ustrzegła się wyrażen żargonowych opisując stosowane metody i otrzymane wyniki. Moje uwagi dotyczące tych niewielkich uchybień chętnie prześlę Doktorantce po obronie rozprawy. Zauważyłam też nieprawidłowe odwołanie do pracy opisującej sekwencję markerową Ba813 (powinna być: Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Thérasse J, Guesdon JL. Isolation of a



specific chromosomic DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;15:223-231. doi: 10.1111/j.1574-695X.1996.tb00088.x.). Zwróciłam również uwagę na nietypowy sposób przedstawienia cytowań literatury. Zazwyczaj pozycje literatury oznaczone numerami są przywoływane w tekście po kolei. Natomiast, jeśli ułożone są alfabetycznie, w tekście przywoływane są nazwiska pierwszych autorów i daty edycji. Autorka wybrała wersję hybrydową, która utrudnia odnoszenie się do pozycji literatury cytowanych w rozprawie. Chcę jednak zdecydowanie podkreślić, że te uwagi, nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę wartości pracy Pani mgr Nakoniecznej.

Rozprawę rozpoczyna przejrzyste napisany **Wstęp**, w którym przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący zakresu tematyki pracy. Autorka scharakteryzowała bakterię *Bacillus anthracis*, wytwarzane przez nią czynniki wirulencji i problemy dekontaminacji powierzchni nią skażonych oraz opisała drogi prowadzące do powstania różnych form wąglika. Następnie skupiła się na bakteriofagach, ich cyklach życiowych i możliwości stosowania terapii fagowych. Autorka opisała też enzymy lityczne bakteriofagów – endolizyny fagowe, wady i zalety ich stosowania, a całość poruszanych zagadnień zamknęła klamrą pisząc o fagach *B. anthracis* i ich endolizynach. Rozdział ten opatrzone został 5 rycinami ułatwiającymi lekturę. Chociaż Wstęp nie jest spójny tematycznie, jest dobrze skomponowany, bowiem prowadzi czytelnika prosto do **Celów pracy**, przy tym zawiera informacje potrzebne i zasadniczo wystarczające do interpretacji wyników, zaprezentowanych w dalszych częściach rozprawy. Elementami, które mogłyby się znaleźć we wstępie jest informacja dotycząca; po pierwsze budowy ogonka znanych bakteriofagów *B. anthracis* (faga *Gamma*), a po drugie holin, obejmująca też opis ich klas, które potem Autorka przywołuje w części wynikowej.

Cele pracy sformułowane przez Autorkę są następnie precyzyjnie ujęte w **Zadania badawcze**, które jasno pokazują obraz badań opisanych w rozprawie.

Część metodyczna pracy jest bardzo obszerna, opisana została w dwóch oddzielnych rozdziałach **Materiały** i **Metody**; zawiera opis bogatego warsztatu metodycznego Autorki – od technik mikrobiologicznych, poprzez techniki biologii molekularnej, mikroskopię elektronową do metod bioinformatycznych. Mam w kwestii opisu drobną uwagę, dotyczącą Materiałów: Autorka zbyt szczegółowo opisuje przygotowywanie roztworów o konkretnym stężeniu. Zazwyczaj podanie stężenia substancji oraz rodzaju rozpuszczalnika i ew. pH są wystarczające.

**Wyniki** rozprawy przedstawione są na 45 stronach. W rozdziale wyróżnionych zostało 5 części, które zasadniczo odpowiadają przedstawionym wcześniej Zadaniom badawczym. Pierwsze zadanie, jakie postawiła przed sobą Autorka dotyczyło wyizolowania z próbek środowiskowych fagów *B. anthracis* i ich charakterystyki. Pani mgr Aleksandra Nakonieczna wyizolowała 3 nowe fagi *B. anthracis*, J5a, F16Ba i z1a, które opisała jako specyficzne dla tego gatunku bakterii i określiła ich cechy takie jak okres latencji i plon faga oraz wrażliwość na zmiany pH i temperatury. Następnie przeprowadziła sekwencjonowanie DNA ich genomów oraz analizę tych sekwencji używając zarówno powszechnie stosowanych narzędzi bioinformatycznych, jak i tych, które specyficznie dotyczą analiz bakteriofagów. Ponadto określiła morfologię badanych bakteriofagów, korzystając z mikroskopii elektronowej.

W drugim zadaniu na podstawie wyników analiz Autorka określiła pozycję taksonomiczną badanych fagów, zaklasyfikowała je do rodzaju *Wbetavirus*, przy tym każdy z fagów okazał się na tyle różny od pozostałych, że zaklasyfikowała je do odrębnych, nowych gatunków. Jednocześnie zaproponowała wydzielenie dwóch kładów w rodzaju *Wbetavirus*: pierwszego, J5a, grupującego fagi wyizolowane przez siebie i fagi Negev\_SA, Carmel\_SA i Tavor\_SA, wyizolowane w Izraelu oraz drugiego, którego reprezentantem jest Wbeta,



grupującego znane wcześniej fagi. Poza bioinformatyczną analizą sekwencji Pani mgr Nakonieczna zidentyfikowała sekwencje *cos* na końcu cząsteczek genomów fagów.

W trzecim zadaniu, Doktorantka sklonowała geny kodujące endolizyny z badanych fagów komórkach *Escherichia coli*. Następnie doprowadziła do nadekspresji genów endolizyn z fagów J5a i F16Ba (LysJ i LysF). W kolejnym zadaniu oczyściła białka fuzyjne endolizyn ze znacznikiem histydynowym w chromatografii powinowactwa na złożu z niklem i zbadała ich aktywność lityczną na różnych szczepach z rodzaju *Bacillus*, w tym na zjadliwych szczepach *B. anthracis*. Autorka określiła, że endolizyna LysJ, podobnie jak jej macierzysty fag J5a, hamuje wzrost szczepów *B. anthracis*. Taki wynik został zaobserwowany w obu użytych metodach badania aktywności przeciwbakteryjnej tej endolizyny: w hodowli płynnej i hodowli stałej. Natomiast działanie lityczne drugiej z endolizyn, LysF z faga F16Ba wobec szczepów *B. anthracis* obserwowane było tylko w hodowli płynnej. W hodowli na podłożu stałym Autorka zaobserwowała niewielką aktywność lityczną w stosunku do jednego ze szczepów zjadliwych (szczep PZH).

Wyniki przedstawione w rozprawie mgr Aleksandry Nakoniecznej zostały rzeczowo omówione w rozdziale **Dyskusja**. Po lekturze tego rozdziału jestem przekonana, że Doktorantka jest w pełni dojrzałą naukowczynią, która nie tylko konsekwentnie prowadzi eksperymenty i złożone analizy bioinformatyczne, ale także jest w stanie odpowiednio interpretować uzyskane wyniki na tle aktualnej wiedzy z omawianej dziedziny (przyczożona Bibliografia obejmuje łącznie 201 pozycji literaturowych).

Uważam, że rozprawa Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej przedstawia znaczną wartość jako opracowanie naukowe i w pełni spełnia wymogi merytoryczne i redakcyjne stawiane rozprawom doktorskim. Dzięki logicznie zaprojektowanym eksperymentom i odpowiednio przeprowadzonym analizom bioinformatycznym, których wyniki uwzględniono w części eksperymentalnej, Doktorantka odkryła co najmniej jednego faga, J5a wytwarzającego endolizynę LysJ, który jest dobrym kandydatem do prowadzenia dalszych badań nad fagoterapią zakażeń szczepami *B. anthracis*.

W tym miejscu należy podkreślić, że część wyników opisanych w rozprawie jest efektem realizowanego przez Doktorantkę grantu Preludium przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, a została zawarta w opublikowanej w zeszłym roku pracy w czasopiśmie „Viruses” (Nakonieczna et al. Three Novel Bacteriophages, J5a, F16Ba, and z1a, Specific for Bacillus anthracis, Define a New Clade of Historical Wbeta Phage Relatives. Viruses. 2022 Jan 21;14(2):213. doi: 10.3390/v140202130), w której Doktorantka jest pierwszą autorką. Jej kluczowa rola w powstaniu tej pracy została szczegółowo opisana (“Conceptualization, A.N. and M.Ł.; methodology, A.N., M.Ł. and P.R.; formal analysis, A.N., M.Ł. and P.R.; investigation, A.N. and M.F.; resources, A.N.; writing—original draft preparation, A.N., M.F., M.K. and M.Ł.; writing—review and editing, A.N., M.K., L.M. and M.Ł.; visualization, A.N., P.R., M.F. and M.Ł.; supervision, A.N., L.M. and M.Ł.; project administration, A.N.; funding acquisition, A.N. and M.Ł.”).

Lektura przedstawionej rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka pytań i komentarzy, o ustosunkowanie się do których proszę Doktorantkę w czasie obrony:

1/ Na jakiej podstawie wyciągnięty został wniosek, że bakteriofagi są, jak pisze Autorka „najbardziej rozpowszechnionymi organizmami w przyrodzie, już od pewnego czasu uważane za formy żywe”. To czy uznaje się je za jednostki żywe zależy przede wszystkim od przyjętej definicji życia, która ma znaczenia filozoficzne. Zatem, czy za podstawę uzna się zdolność do replikacji swojego materiału genetycznego i do ewolucji prowadzącej do adaptacji do zajmowanej niszy ekologicznej, czy zdolność do przeprowadzania



swojego własnego metabolizmu, w tym niezależnej replikacji materiału genetycznego. Przy tym określenie „organizm” w stosunku do wirusa, traktuję jako mocno na wyrost. Interesującą dyskusję na temat „Are viruses alive?” przeprowadzili dwaj profesorowie mikrobiologii Nigel Brown i David Bhella w Towarzystwie Mikrobiologicznym w Londynie, która została opublikowana w 2016 w *Microbiology Today*. Niezależnie od tego po której stronie Autorka się opowiada, powinna co najmniej odnieść się do przyjętych przez siebie kryteriów.

2/ Dlaczego Autorka tak pobieżnie opisała w rozdz. 6.1.1. początki pracy? Zabrakło mi informacji, konkretnie ile fagów Autorka zbadała na początku swojej pracy („5 nowych i kilkanaście z kolekcji”), z jakich próbek środowiskowych pochodziły, jakie były wyniki badań, oraz z jakiego powodu pozostałe fagi zostały wyłączone z dalszych badań? Nie znalazłam także informacji dlaczego Autorka porzuciła prace nad endolizyną z faga z1a. Podobnie lakonicznie opisany jest rozdział 6.4.4, w którym Autorka przedstawiła badanie wrażliwości szczepów *Bacillus* na LysJ i LysF. Przypuszczam, że dla ułatwienia czytania tekstu przydałaby się tabela podsumowująca wrażliwość każdego z badanych szczepów rodzaju *Bacillus* na danego faga i na jego endolizynę, tę ostatnią – w obu wersjach eksperymentalnych, w hodowli płynnej i na podłożu stałym, jeśli takie badanie było wykonane.

3/ Zabrakło zaprezentowania wyników dotyczących ustalenia optymalnego współczynnika infekcji (MOI), opisanych w Metodach w rozdziale 5.1.5 oraz informacji, dlaczego w eksperymencie badania krzywej jednostopniowego wzrostu zmieniana była pożywka z TSB na LB.

4/ Wektory z serii pET są pochodnymi plazmidu pBR322 (*oriV<sub>pMB1</sub>*) i mają średnio w komórce 15-20 kopii. Nie są to zatem wektory o niskiej, lecz średniej liczbie kopii. Choć oczywiście można powiedzieć, że poziom ekspresji podstawowej sklonowanego genu (a nie sama ekspresja) jest w komórkach niosących plazmid z serii pET znacznie niższy (ale nie zmniejszony) niż poziom ekspresji tego genu sklonowanego w wektorze ulegającym replikacji dzięki replikonowi pozbawionemu genu *rop/rom*.

5/ Przy interpretacji wyników dotyczących stabilności termicznej fagów, zaprezentowanych na rycinie 15, byłoby lepiej przeprowadzić analizę istotności statystycznej otrzymanych wyników, żeby nie musieć pisać o znacznych czy nieznacznych spadkach miana fagów. Podobnie przedstawiony wpływ fagów, czy też oczyszczonych endolizyn fagowych przedstawiony jako spadek wartości gęstości optycznej hodowli bakterii stanowi dopiero wstępną charakterystykę obiektów badawczych, która z pewnością zostanie w kolejnych latach pogłębiona. Opisane w rozdziale 6.4.4 wyniki są dość arbitralnie określone jako „znaczny spadek gęstości optycznej”. Czy efektu spadku gęstości optycznej hodowli nie byłoby wygodniej przełożyć na spadek liczby żywych komórek? Poproszę, o zaproponowanie kierunków, w których należałoby rozwijać zapoczątkowane przez Panią analizy.

6/ Do jakiego kladu został zaklasyfikowany fag AP631, który w zależności od białka, które jest użyte do analizy podobieństwa lokuje się bliżej faga Negev\_SA czy Trevor\_SA lub bliżej kladu Wbeta?

7/ Do jakich elementów struktury TrwB jest podobne np. białko F16Ba\_20? TrwB to białko sprzęgające (*coupling protein*) z plazmidu R388, zaangażowane w jego transfer koniugacyjny. TrwB jest ATPazą o długości 507 aa, natomiast F16Ba\_20 jest od niego ponaddwukrotnie mniejsze (197 aa). Analiza struktury krystalograficznej białka TrwB pokazuje domenową budowę tego białka z domeną transmembranową na końcu aminowym (dwie transmembranowe alfa-helisy z krótką pętlą periplazmatyczną) oraz na końcu



karboksylowym – z konserwowaną domeną wiążącą nukleotydy i małą domeną All-Alpha wystającymi do cytoplazmy.

Należy wspomnieć, że Doktorantka jest współautorką trzech innych prac naukowych, dwóch eksperymentalnych i jednej przeglądowej opublikowanych w Journal of Applied Microbiology w 2015, 2019 (praca przeglądowa) i w Annals of Agricultural and Environmental Medicine w 2019. W pracy chronologicznie najstarszej, z 2015, Doktorantka jest pierwszą autorką.

**W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje wiedzę Doktorantki w zakresie prowadzonej tematyki badawczej oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych czyli spełnia kryteria zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Nakoniecznej do publicznej obrony.**

dr hab. Izabela Kern-Zdanowicz