

07. 03. 2023 r.

Dr hab. Anna Brzostek
Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

Ocena pracy doktorskiej mgr Eweliny Łojewskiej pt. „Wykorzystanie różnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek o charakterze przeciwbakteryjnym”.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Tomasza Sakowicza i promotora pomocniczego dr Tomasza Kowalczyka. Należy podkreślić, że Doktorantka przystępując do realizacji celów pracy doktorskiej miała do dyspozycji bardzo dobry warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową oraz wiedzę i doświadczenie naukowe promotorów.

Pracę doktorską Pani mgr Eweliny Łojewskiej stanowi zbiór dwóch prac eksperymentalnych, spójnych tematycznie oraz dwóch prac poglądowych, opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku cytowalności IF 8.371 i liczbie punktów ministerialnych 165. We wszystkich czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i zarówno autorem korespondującym a załączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do Jej kluczowej roli w realizacji opisywanych badań. Na podkreślenie zasługuje także umiejętność Doktorantki w pozyskiwaniu finansowania na badania własne (dwie dotacje celowe dla młodych naukowców) oraz umiejętność nawiązywania współpracy krajowej (Zakład Mikrobiologii Laboratoryjnej i Immunologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi) i zagranicznej, co zaowocowało krótkoterminowym stażem w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Niemczech.

Przedmiotem zainteresowania Doktorantki są substancje nieantybiotyczne, głównie bakteriocyyny posiadające właściwości przeciwbakteryjne. Podjęta przez mgr E. Łojewską



tematyka badań jest bardzo interesująca. Obserwowane w ostatnich latach nadmierne używanie antybiotyków, stosowanych głównie w hodowli zwierząt, prowadzi do niebezpieczeństwa skażenia żywności i zanieczyszczenia antybiotykami wielu ekosystemów. Szerzące się stosowanie antybiotyków prowadzi zaś do pojawiania się szczepów bakterii antybiotykoopornych, co skutkować będzie w przyszłości wzrostem śmiertelności z powodu nieuleczalnych infekcji bakteriami opornymi na dostępne antybiotyki. Zauważona skala problemu przyczynia się do podjęcia radykalnych zmian mających na celu kontrolę infekcji bakteryjnych, rozpowszechnienie szczepień, stosowanie antybiotyków celowanych, zmniejszenie ekspozycji na antybiotyki w rolnictwie i rozwój alternatywnych, efektywnych zamienników dla antybiotyków. Główną grupą substancji stanowiących alternatywę dla antybiotyków są białka pochodzenia eukariotycznego lub bakteryjnego posiadające właściwości przeciwbakteryjne, które mogą być z powodzeniem stosowane zarówno w leczeniu ludzi, jak i w produkcji żywności i w rolnictwie.

W komórkach żywych organizmów występują białka AMP o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które są wysoce zróżnicowane pod względem struktury, aktywności oraz mechanizmu działania. Najbardziej znanymi białkami AMP są bakteriocyny, należące do bakteryjnych białek przeciwdrobnoustrojowych działających już w niewielkim stężeniu piko lub nanomolowym, o wąskim spektrum działania. Najbardziej znaną i dobrze scharakteryzowaną bakteriocyną jest kolicyna M produkowana przez szczepy *E. coli*. Dostępne informacje opublikowane przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków nt. salmocyn i kolicyn świadczą o dużym potencjale aplikacyjnym tych substancji oraz o bezpieczeństwie ich stosowania. Z tego względu podjęte przez Doktorantkę badania mające na celu wydajną i bezpieczną produkcję białek o charakterze przeciwbakteryjnym, a mianowicie kolicyny M i salmocyny z wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych roślin i bakterii wydają się być atrakcyjne.

Załączone publikacje stanowiące podstawę recenzowanej pracy doktorskiej zostały poprzedzone informacjami na temat źródeł finansowania badań naukowych. Ponadto Doktorantka zaprezentowała swój dorobek naukowy uwzględniając publikacje nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz liczne doniesienia konferencyjne. Dodatkowo mgr E. Łojewska zamieszcza w swojej rozprawie doktorskiej rozdziały opisane w języku polskim oraz angielskim zatytułowane: *streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i*



wnioski oraz literatura. W spisie treści zamieszczonym na str. 2 nie wszystkie te rozdziały zostały wymienione. Zastanawia mnie fakt załączenia zarówno opisowej części w języku polskim i angielskim wraz z powieleniem literatury? Czy samo streszczenie w języku angielskim nie byłoby wystarczające?

Ponadto w streszczeniu zabrakło zdania, które podsumowałoby Pani osiągnięcie naukowe.

W części „Wstęp”, Doktorantka przybliżyła temat szerzającej się oporności na antybiotyki i konsekwencji ich nadużywania w hodowli zwierząt oraz w leczeniu ludzi co zwraca uwagę w kierunku poszukiwania alternatywnych rozwiązań jakimi są białka AMP, poświęcając więcej uwagi bakteriocynom i systemom do produkcji rekombinowanych bakteriocyn z wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych roślin. Następnie Doktorantka nakreśliła Cel pracy, który moim zdaniem powinien zostać opisany w punktach wskazując na podjęte zadania zmierzające do jego osiągnięcia. W części Materiały i metody w punkcie 2. dotyczącym konstrukcji wektorów ekspresyjnych, opis klonowania kasety ekspresyjnej został nieco zagmatwany pomimo zamieszczenia schematów kasety. Wątpię, czy rysunki wektorów i uwzględnić informacje dotyczące genów oporności na antybiotyki i wykorzystane miejsca restrykcyjne do klonowania insertów. Sformułowanie *rekombinacji wektora dokonano ...* jest niepoprawne i powinno zostać zamienione na: do konstrukcji rekombinowanego wektora pCAMBIA 1305.1 noszącego roślinną kasetę ekspresyjną ... Podobnie sformułowanie *poprawność klonowania ...potwierdzona została na podstawie wzoru restrykcyjnego po hydrolizie potencjalnych rekombinatów...* wymaga korekty. Myślę, że Doktorantka miała na myśli DNA plazmidowy wyizolowany z potencjalnych rekombinatów? Przy reakcji PCR warto byłoby wpisać jakiej polimerazy Pani używała do amplifikacji. Reasumując ten punkt wymaga większego doprecyzowania informacji aby można było zrozumieć schemat konstrukcji rekombinowanych wektorów do produkcji badanych bakteriocyn. W pkt.3 Transformacja genetyczna bakterii używa Pani dwa różne szczepy *E. coli*: NM 522 i DH5-Alpha, proszę wyjaśnić z jakiego powodu? Ponadto sformułowanie *transformację kolonii bakteryjnych ...potwierdzono przez PCR* jest niewłaściwe. **Proszę wyjaśnić dlaczego używa Pani do transformacji wektora pCAMBIA 1305.1-colM płytek hodowlanych suplementowanych kanamycyną, rifampicyną i streptomycyną?**

W punkcie 6 str.18 pisząc o *jakości i ilości próbek RNA* zapewne chodziło o stężenie RNA?



W punkcie 9, str. 20 opisując metody oznaczania aktywności mikrobiologicznej bakteriocyn wykorzystuje Pani dwie różne metody, inną dla kolicyny M i inną dla salmocyny M? Czym były podyktowane wybory tych metod? W tej części pracy wkradły się pewne błędy literowe tj.: $5 \times 10^5 \text{CFU}$, inkubacja w 35°C , 37°C .

W rozdziale Wyniki pisząc o *umieszczeniu genu kolicyny M w strukturze wektora binarnego* chodziło zapewne o sklonowanie genu, a dodatkowo w tym miejscu należało zamieścić nazwę wektora użytego do klonowania. Ponadto w kolejnym akapicie zapis *a ich obecność potwierdzono pozytywnymi wynikami testu Western blot* powinien zostać doprecyzowany *Jakich przeciwciał użyto do potwierdzenia rekombinowanych białek w liniach roślinnych?*

Na str. 23 opis dotyczący aktywności biologicznej kolicyny M jest zbyt skrótowy, co oznacza szerokie spektrum szczepów bakteryjnych? Skąd wzięty się 24 szczepy a w Tabeli 1 jest ich mniej? W jakim celu w Tabeli 1 zamieszczono *Pseudomonas aeruginosa*? W tekście nie ma odnośników do Tabeli 1 i 2. Ponadto tytuł Tabeli 2 powinien zostać zmieniony a opis antybiotyków pod tabelą powinien być w języku polskim. W odniesieniu do salmocyny M w części Wyniki (str. 24) nie powinno się używać sformułowania *jej obecność...została potwierdzona przy pomocy wybranych technik molekularnych*. Zamiast tego powinny zostać wymienione konkretne techniki. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie *z jakiego powodu do produkcji rekombinowanej salmocyny M wybrała bakteryjny system ekspresyjny zamiast roślinnego, który zastosowała do produkcji kolicyny M?*

W ostatnim rozdziale zatytułowanym Podsumowanie i wnioski Doktorantka zwróciła uwagę na fakt, otrzymania po raz pierwszy transgenicznego tytoniu szlachetnego produkującego aktywną kolicynę M co stanowi o innowacyjności prowadzonych przez Nią badań naukowych. Na podkreślenie zasługuje również identyfikacja w genomie *Salmonella enteritica* kolicynopodobnej bakteriocyny- salmocyny M i nadprodukcja aktywnego białka, o właściwościach bójczych wobec szczepów *E. coli* i różnych gatunków *Salmonella*, w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Niemniej jednak sformułowanie *opisano możliwość jej wytwarzania i pozyskiwania w komórkach* nie jest poprawne. Nie używa się słowa *antybiotykoodporność* (str. 27) lecz *antybiotykooporność*. Uważam, że ten rozdział powinien składać się z części podsumowującej, w której Doktorantka przedyskutowałaby nieco szerzej swoje badania w odniesieniu do badań opisanych w literaturze światowej i jasno sformułowanych, wypunktowanych wniosków wynikających z przeprowadzonych prac



eksperymentalnych załączonych w rozprawie doktorskiej. Jednocześnie, należy docenić szeroką wiedzę teoretyczną i znajomość literatury naukowej mgr. E. Łojewskiej czego rezultatem są dwie prace przeglądowe włączone do rozprawy doktorskiej, szeroko opisujące zagadnienia związane z substancjami nieantybiotycznymi pochodzenia eukariotycznego i prokariotycznego w zwalczaniu odzwierzęcych zakażeń bakteryjnych przenoszonych przez żywność (*Current Microbiology*, 2021) oraz zagadnienia opisujące wydajne metody nadprodukcji rekombinowanych białek z wykorzystaniem roślinnych systemów ekspresyjnych (*Protein Expression and Purification*, 2016).

Na zakończenie chciałabym poprosić **Doktorantkę o wyjaśnienie** powodu wykorzystania dwóch różnych systemów do ekspresji i produkcji białek rekombinowanych w odniesieniu do salmocyiny i kolicyny? Czy planuje Pani podjąć dalsze badania z tymi białkami?

Podsumowanie:

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Eweliny Łojewskiej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i ciekawe wyniki. Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Eweliny Łojewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Anna Brzostek

