



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań
tel. +48 61 848 72 02
e-mail: kbib@up.poznan.pl

WYDZIAŁ ROLNICTWA,
OGRODNICTWA
I BIONŻYNIERII
Katedra Biochemii i Biotechnologii

dr hab. n. med. Anna Woźniak
Kierownik Zespołu Diagnostyki Molekularnej
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy
Ul. Dojazd 11
60-632 Poznań

Poznań, dnia 27.03.2023

Recenzja

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

wykonanej pod kierunkiem

Promotora: dra hab. Tomasza Sakowicza

Promotora pomocniczego: dra Tomasza Kowalczyka

w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki

na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Łojewskiej przygotowana została na podstawie decyzji Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne (pismo z dnia 13.01.2023 w sprawie powołania mojej osoby na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Eweliny Łojewskiej, podpisane przez Przewodniczącą Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne prof. dr hab. Agnieszkę Marczak).

Ocena doboru problematyki badawczej i tematu rozprawy

Praca doktorska Pani mgr Eweliny Łojewskiej dotyczy problematyki wykorzystania różnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek o charakterze przeciwbakteryjnym.

Odkrycie penicyliny przez Sir Alexandra Fleminga w 1928 roku było jednym z rewolucyjnych odkryć w medycynie. Jednak już w krótkim czasie okazało się, że wykorzystanie antybiotyków niesie ze sobą ryzyko rozwinienia u bakterii antybiotykooporności. Szacunki przedstawiane przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) i Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju, dotyczące liczby zakażeń wywoływanych przez bakterie odporne na antybiotyki oraz liczby zgonów pacjentów, które powodowane są brakiem alternatywnej ścieżki terapeutycznej zakażeń są wysoce alarmujące. Zjawisko antybiotykooporności stanowi zatem duże wyzwanie medyczne, społecznie i ekonomiczne. Aby podkreślić znaczenie świadomego społeczeństwa w walce z antybiotykoopornością, w 2008 roku Komisja Europejska na wniosek ECDC ustanowiła dzień 18 listopada jako Europejski Dzień Wiedzy o Antybiotykach. Z drugiej strony, z uwagi na dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej można oczekiwać, że te technologie przyczynią się do złagodzenia skutków antybiotykooporności. Uważam zatem, że tematyka przedstawiona w pracy doktorskiej jest niezwykle trafna, koresponduje z wyzwaniami współczesnej biomedycyny i nawiązuje do aktualnej tematyki realizowanej przez wiodące ośrodki naukowe.

Ocena układu pracy

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Łojewskiej składa się ze 110 stron wydruku komputerowego i obejmuje następujące rozdziały: Informacje wprowadzające: Źródła finansowania, Dorobek naukowy, Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie i wnioski, **Literatura (35 aktualnych pozycji)**, Summary, Introduction, Aim of the study, Materials and methods, Results, Resume and conclusion, References. Praca zawiera również wydruki publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, Oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Praca została zredagowana poprawnie, a sporadyczne niedoskonałości edytorskie (brak poszczególnych rozdziałów w spisie treści: w języku polskim: brak w spisie: Cel pracy str. 13, Podsumowanie i wnioski str. 26; w języku angielskim: Materials and methods str. 37, References str. 49) nie wpływają na **pozytywną ocenę układu rozprawy doktorskiej**, dlatego też je pomijam.

Ocena indywidualnego wkładu kandydatki w powstanie pracy.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi cztery publikacje naukowe:

1. Łojewska E*, Sakowicz T, Kowalczyk A, Konieczka M, Grzegorzczak J, Sitarek P, Skala E, Czarny P, Śliwiński T, Kowalczyk T. Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity. *Plant Biotechnology Reports*.

2020. Punktacja z 2020: 40 pkt MNiSW; IF=2.010; 5YIF=1.907;
2. Łojewska E*, Sakowicz T, Korycka-Machała M, Kowalczyk T. Heterologous overexpression and preliminary antimicrobial activity test of salmocin M, a novel colicin M-like bacteriocin against *Salmonella* sp. *Archives of Microbiology*. 2022. Punktacja z 2021 (punktacja dla 2022 będzie opublikowana w drugiej połowie 2023): 70 pkt MEiN; IF=2.667; 5YIF=2.729;
 3. Łojewska E*, Kowalczyk T, Sakowicz T, Olejniczak S. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 2016. Punktacja z 2016: 15 pkt MNiSW; IF =1.351; 5YIF=1.473;
 4. Łojewska E*, Sakowicz T. An alternative to antibiotics - selected methods to combat zoonotic foodborne bacterial infections. *Current Microbiology*. 2021. Punktacja z 2021: 40 pkt MEiN; IF=2.343; 5YIF=2.408;

Publikacja oznaczona numerem 1 jest pracą oryginalną opublikowaną w 2020 roku w czasopiśmie *Plant Biotechnology Reports* (parametry bibliometryczne z 2020 roku: 40 pkt MNiSW; IF=2.010; 5YIF=1.907;). Publikacja oznaczona numerem 2 stanowi również pracę oryginalną opublikowaną w 2022 roku w czasopiśmie *Archives of Microbiology* (parametry bibliometryczne z 2021 roku: 70 pkt MEiN; IF=2.667; 5YIF=2.729). Publikacja oznaczona numerem 3 jest pracą przeglądową opublikowaną w 2016 roku w czasopiśmie *Protein Expression and Purification* (parametry bibliometryczne z 2016 roku: 15 pkt MNiSW; IF =1.351; 5YIF=1.473). Publikacja oznaczona numerem 4 jest pracą przeglądową opublikowaną w 2021 roku w czasopiśmie *Current Microbiology* (parametry bibliometryczne z 2021 roku: 40 pkt MEiN; IF=2.343; 5YIF=2.408).

Oświadczenia o wkładzie Doktorantki w prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wyraźnie wskazują na wiodący udział Autorki. Udział ten obejmuje szeroki zakres prac od tworzenia koncepcji, wykonania prac eksperymentalnych i bioinformatycznych, opracowanie wyników do przygotowania i edycji manuskryptu. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pozostają w zgodzie z deklaracjami Doktorantki.

Na uznanie zasługuje fakt, że mgr Ewelina Łojewska jest pierwszym oraz korespondencyjnym autorem we wszystkich czterech pracach. Suma punktów (według listy czasopism MEiN) przedstawionych powyżej prac, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 165, sumaryczny *Impact Factor* – 8.371, sumaryczny pięcioletni IF: 8.517.

Doktorantka wykazała również publikacje, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej (sześć prac, parametry bibliometryczne zgodne z rokiem opublikowania: 229 pkt MEiN; IF=11.732; 5YIF=12.213), wykaz doniesień konferencyjnych (10 doniesień),

informacje o stażu zagranicznym (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; Plant Reproductive Biology Department, Gatersleben – Niemcy), uzyskanym patencie (Łojewska E, Kowalczyk T, Sakowicz T. Sposób otrzymywania rekombinowanych bakteriocyn w kulturach korzeni włośnikowatych oraz zastosowanie rekombinowanych bakteriocyn w kulturach korzeni włośnikowatych jako dodatku mikrobiologicznego do pasz. Patent nr 236996) oraz uzyskanej Nagrodzie Rektora Uniwersytetu Łódzkiego w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – Uczelnia Badawcza” za uzyskanie patentu krajowego. Dorobek naukowy Doktorantki oceniam wysoko.

W części pracy przedstawiającej Informacje wprowadzające, Autorka wykazuje źródła finansowania, którymi są dwie Dotacje celowe dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich oraz Program stażowy Erasmus+ dla szkolnictwa wyższego realizowany w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Niemcy, Gatersleben. Kierownikiem tych projektów była Doktorantka, co nadaje wysoką ocenę kompetencji mgr Łojewskiej i jednocześnie znacznie zwiększa możliwości uzyskania w przyszłości grantów ze źródeł zewnętrznych. W dalszej kolejności Autorka informuje, że pracę zrealizowano we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Laboratoryjnej i Immunologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Pracownią Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk.

Ocena merytoryczna

W pierwszej części rozprawy, Doktorantka opisała wstęp literaturowy dotyczący problematyki antybiotykooporności, ze szczególnym uwzględnieniem przyczyn ich nadmiernego użycia oraz proponowanych algorytmów przeciwdziałania narastającej antybiotykooporności. Autorka, konsekwentnie do tytułu swojej pracy doktorskiej, skupiła swoje rozważania na strategii poszukiwania i rozwoju alternatyw dla antybiotyków, tj. białek o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (ang. *antimicrobial proteins* - AMP), głównie bakteriocyn z grupy kolicyn, syringacyn, burkhocyn, pektocyn, salmocyn. Magister Łojewska przedstawiła również problematykę wykorzystania ekspresyjnych platform roślinnych i bakteryjnych w procesie projektowania wydajnych i bezpiecznych metod produkcji bakteriocyn. Zakres opisu wstępu literaturowego wskazuje na dużą znajomość omawianej przez Doktorantkę tematyki.

W dalszej kolejności Doktorantka przedstawia cel główny i cele szczegółowe swojej pracy, które dotyczyły opracowania systemu produkcji rekombinowanej bakteriocyny w komórkach roślinnych i bakteryjnych, a także poszukiwania nowych bakteriocyn o właściwościach przeciwbakteryjnych wobec bakterii wywołujących zakażenia drogą pokarmową i potwierdzenie ich właściwości biologicznych. **Cel pracy został sformułowany**

zwięźle i spełnia oczekiwania względem otrzymanych rezultatów.

W rozdziale Materiały i metody, mgr Łojewska opisuje poszczególne podrozdziały, w tym: Analiza bioinformatyczna sekwencji DNA bakteriocyn; Konstrukcja wektorów ekspresyjnych; Transformacja genetyczna bakterii; Agroinfekcja i roślinne kultury *in vitro*; Izolacja genomowego DNA z transgenicznych linii *N. tabacum*; Izolacja całkowitego RNA z transgenicznych linii *N. tabacum*; Izolacja, identyfikacja i oczyszczanie białek rekombinowanych; Oznaczenie cytotoksyczności rekombinowanych bakteriocyn; Oznaczenie aktywności mikrobiologicznej rekombinowanych bakteriocyn. **Obrane przez Doktorantkę metody badawcze są prawidłowe i umożliwiają realizację założonych prac eksperymentalnych wchodzących w skład cyklu.**

W kolejnym rozdziale, **Autorka omawia w sposób jasny i klarowny uzyskane wyniki badań.** Odnośnie badań nad uzyskaniem rekombinowanej kolicyny M, przedstawiona jest strategia konstrukcji kasyety ekspresyjnej, transformacji komórek *Nicotiana tabacum* z wykorzystaniem tego wektora oraz komórek *Agrobacterium tumefaciens*, selekcja, potwierdzenie integracji transgeny, namnożenie biomasy, izolacja i weryfikacja obecności i aktywności biologicznej białka (aktywność antymikrobiologiczna na szczepach bakteryjnych wzorcowych i klinicznych *E. coli* i *K. pneumoniae*, potencjalna cytotoksyczność na linii komórkowej L929 i HeLa). Wyniki te zostały opublikowane w pracy nr 1 pt.: „*Production of recombinant colicin M in Nicotiana tabacum plants and its antimicrobial activity*”.

Druga część wyników obejmuje rezultaty prac wykonanych w zakresie: poszukiwania niezbadanych do tej pory homologów kolicyny M w genomie bakterii gatunku *Salmonella*; selekcja genu, utworzenia kasyety ekspresyjnej, transformacji w komórkach szczepu *E. coli* Rosetta, analiz molekularnych i mikrobiologicznych uzyskanego białka rekombinowanego - salmocyny M (aktywność antymikrobiologiczna na szczepach bakteryjnych *E. coli* i *Salmonella*). Przedstawione wyniki ukazały się w pracy nr 2 pt.: „*Heterologous overexpression and preliminary antimicrobial activity test of salmocin M, a novel colicin M-like bacteriocin against Salmonella sp.*” Uzupełnieniem badań oryginalnych w cyklu publikacji przedstawionych do oceny, są informacje zawarte w dwóch pracach przeglądowych, które dotyczą charakterystyki metod ekstrakcji i oczyszczania rekombinowanego białka pochodzenia roślinnego (praca nr 3 pt.: „*Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins*”) oraz przeglądu metod zwalczania odzwierzęcych infekcji bakteryjnych przenoszonych przez żywność (praca nr 4 pt.: „*An alternative to antibiotics - selected methods to combat zoonotic foodborne bacterial infections*”).

Następnie, Doktorantka przedstawia podsumowanie i celne wnioski, gdzie dokonuje skrupulatnej analizy aplikacyjności wyników swoich badań i trafnie uzasadnia wybór alternatywnej do antybiotyków, najkorzystniejszej ścieżki terapii zakażeń bakteryjnych, w tym

antybiotykoopornych.

Wobec problematyki opracowywania alternatywnych środków leczenia innych niż stosowanie antybiotyków, **uwązam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają duży potencjał uytylitarny**, co znacznie podwyższa wartość przedstawionej do oceny dysertacji.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Uzyskanie transgenicznej rośliny tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*) produkującej aktywne białko, rekombinowaną bakteriocynę, kolicynę M.
2. Uzyskanie w komórkach bakteryjnych kolicynopodobną bakteriocynę salmocynę M z *Salmonella enterica*.
3. Wykazanie, że rekombinowane bakteriocyny mogą być efektywnie wytwarzane w różnych typach komórek stosowanych jako platformy ekspresyjne (roślinne, bakteryjne).
4. Uzyskanie oczyszczonych białek o aktywności antymikrobiologicznej, również względem bakterii opornych na antybiotyki.

W podsumowaniu należy podkreślić spójność tematyczną cyklu prac przedstawionych przez Doktorantkę i konsekwencję, z którą prowadziła kolejne etapy badań. Sposób wykonywania analiz, umiejętność stawiania ostrożnych wniosków świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Dokładność w opracowywaniu harmonogramu badań i analiz wyników zyskuje się dzięki opiece naukowej doświadczonego w pracy eksperymentalnej promotora.

Zagadnienia, wobec których proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się:

1. Proszę uzasadnić dlaczego wybrano dwa różne systemy ekspresyjne dla dwóch różnych białek.
2. Czy planuje się wykonanie badań cytotoksyczności dla salmocyny?

Wniosek końcowy

Praca doktorska Pani mgr Eweliny Łojewskiej została napisana poprawnie, zgodnie z wymaganiami stawianymi pracom dyplomowym. Dysertacja stanowi spójny zestaw publikacji przedstawionych i omówionych w czytelny sposób. **Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pracę oceniam pozytywnie.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Łojewskiej pt.: „Wykorzystanie różnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek o charakterze przeciwbakteryjnym ” wykonanej pod kierunkiem Promotora: dra hab. Tomasza Sakowicza oraz Promotora pomocniczego: dra Tomasza Kowalczyka w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. z późn. zm.). Zwracam się zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Łojewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



dr hab. n. med. Anna Woźniak