



Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

data 07.02.2023 r.

dr hab. Beata Zalewska-Piątek, prof. uczelni

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Jaroszewicz pt. **„Konstrukcja nowego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84”**.
(**„Construction of a novel phage display system based on a thermophilic bacteriophage TP-84”**)

Poniższa recenzja została wykonana w odpowiedzi na decyzję Rady Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku, powołującej mnie do komisji doktorskiej w roli recenzenta, na podstawie następujących dokumentów (w formie elektronicznej):

- 1) streszczenie w języku polskim;
- 2) streszczenie w języku angielskim;
- 3) rozprawa doktorska - autoreferat;
- 4) oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie artykułu przeglądowego.

Jednoznacznie stwierdzam, że udostępnione mi dokumenty są kompletne, zarówno pod względem formalnym, jak i merytorycznym. Zapoznanie się z ww. materiałami pozwoliło mi na przygotowanie przedkładanej recenzji.

Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę dotyczyła opracowania funkcjonalnego systemu prezentacji białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84. Dlatego stanowić może nowatorski nurt działań badawczych nad innymi systemami ekspozycji, poza dobrze nam znanymi platformami mezofilnymi.

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana pod promotorstwem Pana Prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna, z Katedry Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego. Zgodnie z informacją zawartą w Komunikacie RDN nr 19/2020 w sprawie składania rozpraw doktorskich, składa się ona z publikacji przeglądowej, jak również wyników jeszcze nieopublikowanych (z wyłączeniem doniesienia konferencyjnego z dnia 18-22.07.22, *Viruses of Microbes*, 2022). Poza dołączoną kopią artykułu przeglądowego wraz z oświadczeniami współautorów (Wstęp teoretyczny), powyższa rozprawa (licząca 155 stron)

zawiera autoreferat obejmujący streszczenie w języku polskim i angielskim, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję, podsumowanie, bibliografię (50 pozycji literaturowych z wyłączeniem referencji w publikacji przeglądowej), wykaz rycin i tabel (w liczbie odpowiednio 47 i 24) oraz dorobek naukowy Doktorantki obejmujący listę publikacji (6), doniesienia konferencyjne (9) oraz udział w projekcie grantowym NCBR jako wykonawca.

Z oświadczeń dołączonych przez współautorów artykułu przeglądowego pt. „Phage display and other peptide display technologies” opublikowanego w *FEMS Microbiology Reviews* (IF₂₀₂₁ = 15,177, 200 pkt według listy MNiSW) jasno wynika, że Pani mgr Weronika Jaroszewicz wniosła bezspornie indywidualny wkład w przygotowanie tekstu manuskryptu (zamieszczonego w rozdziale nr. 3 przedłożonego autoreferatu). W związku z tym udział Doktorantki w powstanie ww. publikacji nie budzi żadnej wątpliwości, a jej dołączenie w ramach części teoretycznej do recenzowanej dysertacji jest w pełni uzasadnione. Poza tą publikacją, Doktorantka jest także współautorem 5 artykułów z listy Journal Citation Report [tj. *Antibiotics (Basel)*. 2021; *Acta Biochim Pol.* 2021; *Med Sci Forum.* 2022; *Microorganisms.* 2022; *Methods Mol Biol.* 2022]. W dwóch pracach wymienionych powyżej Pani Weronika Jaroszewicz jest pierwszym i zarazem korespondencyjnym autorem. Tematyka tych publikacji dotyczy poszukiwania alternatywnych form terapii, opartych na nowych związkach biologicznie czynnych o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej lub przeciwnowotworowej, pozyskiwanych z nietypowych i ekstremalnych siedlisk (takich jak np. jaskinie). Środowiska tego typu wykazują olbrzymią bioróżnorodność bakterii, glonów i grzybów, co stwarza olbrzymie możliwości pozyskiwania antybiotyków i molekuł o potencjalnych właściwościach leczniczych. Szczególnie interesujący jest artykuł z roku 2021 [pt. „Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activities of Compounds Produced by Newly Isolated Streptomyces Strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland)"] opisujący nowo wyizolowane szczepy *Acinetobacter*, pochodzące z jaskiń w Tatrach i wykazujące zdolność do produkcji antybiotyków oraz innych związków bioaktywnych, która jest nasilana przez ich infekcję bakteriofagami. Ta poboczna tematyka wskazuje na bardzo szeroki zakres działalności naukowej prowadzonej przez Doktorantkę. Potwierdza to również udział Doktorantki (jako wykonawcy) w grantie NCBR o podobnej tematyce badawczej (pt. „Systemy nowej generacji dostarczania molekuł bioaktywnych w syntetyzowanych chemicznie i poddanych inżynierii genetycznej nanobiomateriałach”) oraz konferencjach naukowych zarówno krajowych (6), jak i zagranicznych (3).

Ocena merytoryczna i wartość naukowa dysertacji doktorskiej

Technologia „phage display” związana z prezentacją białek, peptydów lub innych molekuł na powierzchni bakteriofagów została opracowana w 1985 r. W 2018 r. została przyznana Nagroda Nobla w dziedzinie chemii za ekspozycję fagową i jej wykorzystanie do projektowania przeciwciał. W ostatnich latach zaobserwować można bardzo duży rozwój tego typu platformy ekspozycyjnej. Brakuje jednak termofilnych systemów prezentacji białek i peptydów z wykorzystaniem fagów. Dlatego badania zrealizowane przez Doktorantkę zmierzające do

otrzymania termofilnej platformy ekspozycyjnej, w oparciu o termofilnego bakteriofaga litycznego TP-84 z rodziny *Siphoviridae*, infekującego termofilnego gospodarza *Geobacillus stearothermophilus*, doskonale wpisują się w ten nurt i równocześnie są pierwszą próbą otrzymania takiego systemu.

Wstęp teoretyczny powyższej dysertacji został przedstawiony w artykule przeglądowym. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo wysoki IF₂₀₂₁ (15,177) i liczba punktów według listy MNiSW (200) ww. publikacji (*FEMS Microbiology Reviews*). Doktorantka opisała bardzo szczegółowo wszystkie dotychczas skonstruowane systemy prezentacji białek, peptydów lub innych molekuł na powierzchni bakteriofagów filamentujących, innych bakteriofagów oraz na powierzchni innych cząstek biologicznych. Przedstawiła także metody generowania bibliotek, wady, zalety i przykłady zastosowań wszystkich systemów w różnych dziedzinach nauki, medycyny i szeroko pojętej biotechnologii. Tak obszerny wstęp wprowadza doskonale czytelnika w tematykę realizowanych zadań badawczych.

Celem pracy, który został bardzo jasno nakreślony przez Doktorantkę, było skonstruowanie systemu prezentowania białek i/lub peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84. Etapy prowadzące do uzyskania tego systemu Pani Weronika Jaroszewicz rozdzieliła na trzy cele pośrednie. Pierwszym z nich była konstrukcja biblioteki genów bakteriofaga TP-84 przy użyciu plazmidu pUC19. Kolejnym było klonowanie genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego pBAC-lacZ, w tym optymalizacja metody klonowania Gibsona oraz Golden Gate. Ostatni etap badań obejmował wprowadzanie *in vitro* modyfikowanego genomu do wirionu bakteriofaga TP-84, celem uzyskania funkcjonalnego systemu prezentowania białek/peptydów na jego powierzchni.

Metodyka badawcza została bardzo obszernie i dokładnie opisana przez Doktorantkę. To umożliwiła odtworzenie poszczególnych eksperymentów. Wyniki zostały zaprezentowane w postaci 42 rysunków i 5 tabel. Podejście eksperymentalne, wykorzystane do realizacji zamierzonych celów pracy, podjęte przez Doktorantkę, było przemyślane i jak najbardziej zasadne. Tok prowadzonych eksperymentów jest uporządkowany. Wnioskowanie zostało skrupulatnie opisane. Interpretacja uzyskanych wyników jest logiczna. Pani Weronika Jaroszewicz uzyskała szereg istotnych wyników, które przedstawiam poniżej:

- skonstruowała bibliotekę natywną oraz biblioteki genów fuzyjnych kodujących wybrane białka strukturalne bakteriofaga TP-84 z dołączonymi fragmentami DNA kodującymi znaczniki molekularne (tj. 3xFLAG oraz 6xHis);
- opracowała metodę tandemowego wstawienia fagowego genu 8 (prawdopodobnie istotnego w procesie prezentowania białek/peptydów), kodującego dodatkowe białko kapsydu, do wektora plazmidowego;
- wstawiła fragment genomu fagowego o wielkości 6600 par zasad do wektora typu BAC (sztucznego chromosomu bakteryjnego) opartego na systemie indywidualnego zwiększania kopii;
- efektywnie transfekowała protoplasty *G. stearothermophilus* materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84, zarówno w formie natywnej jak i rekombinowanej (umieszczonym w wektorze plazmidowym pBAC-lacZ);

- otrzymała aktywne cząstki fagowe posiadające fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu połączone ze znacznikiem molekularnym 3xFLAG eksponowanym na zewnątrz wirionu.

Dyskusja wyników (zamieszczona w jednym rozdziale wraz z Wynikami) została wykonana jak najbardziej prawidłowo i poparta dostępnymi danymi literaturowymi. Bardzo cenny jest również rozdział „Podsumowanie”, w którym Doktorantka w skondensowany sposób zaprezentowała swoje najważniejsze wyniki i osiągnięcia badawcze.

Lektura tej pracy nasunęła mi kilka pytań i bardzo drobnych uwag:

- 1) W procedurze opisującej namnażanie bakteriofaga TP-84 (str. 54) Doktorantka używała chloroformu „aby usunąć ewentualne żywe komórki bakteryjne”. Czy Doktorantka próbowała zastąpić chloroform innym związkim/metodą z uwagi na możliwość denaturacji niektórych fagów i możliwy wzrost ilości resztek komórek bakteryjnych po jego zastosowaniu?
- 2) Co mogło być przyczyną trudności w procedurze klonowaniu genu 8, jak też całego genomu faga TP-84 poza wspomnianą toksycznością produktów fagowych na komórki bakteryjne *E. coli* i jakie są możliwości rozwiązania tego problemu?
- 3) Czy Doktorantka zamierza dalej kontynuować badania dotyczące optymalizacji otrzymanego systemu prezentacji fagowej?
- 4) W pracy można doszukać się drobnych błędów „literowych”, gramatycznych i interpunkcyjnych (np. Chlorek wampnia str. 38, glicerol tabela 7, str. 48) W podrozdziale 5.1.8. Pożywki i podłoża, str. 49-50 brak informacji o producentach niektórych składników pożywek np. pepton, ekstrakt drożdżowy. Podobnie w podrozdziale 5.1.11, str. 51 (Kolby szklane o pojemności 50 ml, 100 ml, 200 ml i 1000 ml, szklane próbówki). Podpis Tabeli 10, str. 65 („Ilości DNA oraz długości megastartera i konstruktów używanych do klonowania metodą RF, obliczone za pomocą programu ze strony <https://www.rf-cloning.org/>”) powinien zostać zmodyfikowany. Pomimo tych drobnych uwag, podkreślam, że cała rozprawa doktorska została opracowana bardzo starannie.

Podsumowując, wyniki uzyskanych badań składające się na rozprawę doktorską Pani mgr Weroniki Jaroszewicz oceniam bardzo wysoko. Podkreślam również ich oryginalność i nowatorskie podejście do wielu aspektów realizowanych zadań badawczych. Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty badań znacząco wzbogacają naszą wiedzę na temat termofilnej platformy do prezentacji białek/peptydów na powierzchni faga TP-84, równocześnie omijając ograniczenia jakie stawiają przed nami systemy prezentacji oparte na bakteriofagach infekujących bakterie mezofilne. Są to również dane cenne ze względu na możliwe wykorzystanie praktyczne.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Zdecydowanie stwierdzam, że praca doktorska Pani Weroniki Jaroszewicz jest nowatorska i ma dużą wartość naukową. Dysertacja jest bardzo dobrze opracowana i gruntownie przemyślana. Cele pracy założone na początku przez Doktorantkę tj. klonowanie sześciu genów termofilnego *Geobacillus stearothermophilus* bakteriofaga TP-84, opracowanie metody wstawiania rekombinowanego genomu do komórek gospodarza, za pomocą transfekcji, oraz wprowadzenie *in vitro* modyfikowanego genomu ww. faga otrzymując system prezentowania białek/peptydów na jego powierzchni, zostały osiągnięte. Było to możliwe dzięki opanowaniu szerokiego wachlarza metodyki doświadczalnej przez Doktorantkę, jej wytrwałości i pracowitości pomimo niepowodzeń doświadczanych podczas prowadzonych eksperymentów.

Z załączonej dokumentacji wynika, że Pani Weronika Jaroszewicz jest osobą bardzo zaangażowaną naukowo. Jest współautorką w sumie 6 prac naukowych, z czego jednej przeglądowej opublikowanej w renomowanym czasopiśmie naukowym, stanowiącej część teoretyczną powyższej dysertacji. Brała udział w 9 konferencjach i jednym projekcie NCBR jako wykonawca. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki, fascynacji nauką i realizowanymi badaniami. Na podstawie przedstawionego dorobku naukowego widać wyraźnie, że doktorantka nie jest ograniczona tylko do tematyki badawczej zrealizowanej w ramach pracy doktorskiej.

W związku z powyższym oświadczam, że przedłożona dysertacja doktorska spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 190 ust. 3 oraz art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Badania wykonane przez Doktorantkę mogą mieć istotne znaczenie o szeroko pojętym charakterze poznawczym i praktycznym. Równocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Jaroszewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 07.02.2023 r.

dr hab. Beata Zalewska-Piątek, prof. uczelni

Beata Zalewska-Piatek