

dr hab. Urszula Zielenkiewicz

Warszawa, 14.02.2023.

Pracownia Środowiskowej i Ewolucyjnej Biologii Systemów
e-mail: ulazet@ibb.waw.pl
tel: 48 22 592-13-07

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Jaroszewicz pt.: "Konstrukcja nowego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84"
dla Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Jaroszewicz opisuje podjętą przez Doktorantkę próbę stworzenia nowego typu platformy prezentowania białek/peptydów, w zamierzeniu użytecznej w odniesieniu do białek stwarzających trudności przy użyciu obecnie dostępnych systemów. Doktorantka zaproponowała uzupełniający tę lukę termostabilny system fagowy wykorzystujący termofilnego bakteriofaga TP-84, którego gospodarzem jest *Geobacillus stearothermophilus*.

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, w którego zespole badania związane z biologią bakteriofagów oraz ich wykorzystaniem biotechnologicznym i terapeutycznym są obecne od wielu lat.

Cel pracy został jasno sformułowany w postaci trzech celów pośrednich tj. i) konstrukcji bibliotek wybranych genów bakteriofaga TP-84, ii) klonowania genomu bakteriofaga TP-84 do wektora plazmidowego oraz iii) wprowadzania *in vitro* modyfikowanego genomu do wirionu bakteriofaga TP-84. Realizacja wszystkich celów pośrednich umożliwiłaby otrzymanie funkcjonalnego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni faga TP-84.

Podjęte w rozprawie doktorskiej badania stanowią dopełnienie rozwijanej od kilkudziesięciu lat technologii z powodzeniem stosowanej w zarówno w badaniach

naukowych jak i w wielu dziedzinach medycyny i farmakologii. Jak wynika z opisu tej tematyki we wstępie rozprawy, mimo istnienia wielu platform, również tych skomercjalizowanych i w formatach wielkoskalowych, wciąż brakuje stosownych dla prezentacji hydrofobowych peptydów lub białek rekombinowanych łatwo formujących ciała inkluzyjne.

Rozprawa doktorska została przedłożona do recenzji w formie monografii (155 stron wraz ze spisem cytowanej literatury) zawierającej standardowe elementy prac doktorskich, którego główną część stanowi omówienie wyników w połączeniu z dyskusją. Zabieg ten pozwolił Doktorantce na jednoznaczne odniesienie się do każdej z bardzo licznych zmian technicznych korygujących kolejne etapy pracy eksperymentalnej, a z drugiej strony uniknąć niepotrzebnej rozwlekłości tekstu. Układ pracy jest dodatkowo niestandardowy z uwagi na ograniczenie rozdziału Wstęp do włączenia opublikowanej (*FEMS Microbiology Reviews*, 2021) pracy przeglądowej, której pierwszą autorką jest doktorantka. Jakkolwiek zabieg ten uważam za w pełni uzasadniony zważywszy na zupełną zgodność tematyki dysertacji i odnośnej publikacji, jednak wzmianka o takim zamiarze i jego uzasadnienie powinna być znaleźć się na początku tego rozdziału. Tym bardziej, że dysertacja jest napisana po polsku, a publikacja po angielsku, co sprawiło, że stanowi nieoczekiwany wtręt w całości. Tymczasem, Doktorantka umieszcza taką wzmiankę dopiero na początku rozdziału Wyniki i Dyskusja. W rozdziale Materiały i Metody autorka rozprawy zawarła bardzo dokładne zestawienia użytych materiałów biologicznych, odczynników, zestawów, aparatury, programów i usług oraz z wielką dokładnością przedstawiła wykorzystane procedury. Wraz z przejrzystymi opisami przeprowadzonych eksperymentów z całą pewnością pozwala na ich odtworzenie. Będzie też zapewne dobrze służył nowym pracownikom zespołu.

Eksperymentalne podejście do stworzenia nowego systemu prezentacji peptydów/białek zaczyna Doktorantka od opracowania warunków hodowli bakterii gospodarza oraz jego infekcji fagiem TP-84, jak również otrzymywania materiału genetycznego faga. Następnie, w części dotyczącej konstruowania samego systemu, pierwotnym zamiarem Doktorantki było przygotowanie bibliotek sześciu potencjalnie odpowiednich do użycia jako białka prezentujące genów bakteriofaga TP-84. Zostały one wytypowane w wyniku analiz proteomicznych jako białka kodowane przez geny strukturalne bakteriofaga. W efekcie systematycznego realizowania kolejnych precyzyjnie zaplanowanych kroków Doktorantka uzyskała plazmidy rekombinowane dla pięciu genów bakteriofaga TP-84 sklonowane do wektora pUC19, zarówno w formie natywnej jak i z dołączonymi sekwencjami kodującymi

znaczniki molekularne "His" oraz "FLAG" na końcach 5' oraz 3' klonowanego genu. Ostatni z wybranych genów, kodujący białko kapsydowe gen 8, ze względu na nie do końca wyjaśnione przyczyny trudności klasycznego klonowania, wymagał osobnego dopracowania metody i ostatecznie został wstawiony do wektora plazmidowego metodą klonowania tandemowego.

Wielkim wyzwaniem eksperymentalnym okazał się zamiar sklonowania całego genomu faga TP-84, kolejny etap tworzenia funkcjonalnego systemu prezentacji peptydów/białek, umożliwiający wprowadzanie modyfikacji w obrębie genomu faga. W tym celu Doktorantka posłużyła się specjalnymi systemami klonowania metodą Gibsona oraz Golden Gate z zastosowaniem wektora typu BAC. Poprzez liczne modyfikacje metody wprowadzane w rezultacie wnikliwych analiz negatywnych częściowych wyników klonowania, wysiłek Doktorantki zaowocował uzyskaniem wektora ze wstawionym fragmentem genomu faga długości 6600 pz .

Sukcesem okazał się ostatni opisany w dysertacji element konstruowania funkcjonalnego termostabilnego systemu prezentacji peptydów/białek, czyli opracowanie metody umożliwiającej wprowadzenie zrekombinowanego genomu TP-84 do komórki gospodarza. Cel ten Doktorantka osiągnęła stosując metodę transfekcji protoplastów gospodarza *G. stearothermophilus* 10 za pośrednictwem nośnika glikolu polietylenowego. Na uwagę zasługuje połączenie w jednym podejściu eksperymentalnym uzyskania zrekombinowanego DNA faga TP-84 w wyniku zmodyfikowanej reakcji Gibsona oraz transfekcji protoplastów gospodarza. Pomimo znikomej wydajności takiej procedury Doktorantka uzyskała faga TP-84 zawierający zrekombinowany gen 12 (kodujący główne białko kapsydu) z dołączonym znacznikiem molekularnym FLAG na C-końcu białka. Dysertację zamyka krótkie podsumowanie, w którym Doktorantka streszcza zawartość publikacji stanowiącej Wstęp, wylicza podstawowe użyte techniki oraz opisuje wszystkie osiągnięte cząstkowe cele.

Należy zaznaczyć, iż wśród celów pracy nie było żadnego ogólnego zagadnienia/problemu badawczego, który mógłby być poddany rozważaniom teoretycznym. Zapewne z tej przyczyny Doktorantka zdecydowała się na połączenie części wynikowej z dyskusją, w której w sposób bardzo przejrzysty odniosła się zarówno do kryteriów wyboru poszczególnych strategii jak i sposobów zmian strategii w przypadku uzyskiwania wyników negatywnych. Dodatkowo, każdy z podrozdziałów Wyników zapoczątkowujący kolejny etap budowania systemu prezentacji białek na powierzchni bakteriofaga jest poprzedzony

stosownym wprowadzeniem oraz zwięzłym wyjaśnieniem zasad działania wybranej do jego realizacji techniki.

Rozprawa doktorska napisana jest bardzo jasno, poprawnie pod względem językowym i z użyciem stosownych terminów naukowych. Na podkreślenie zasługuje sposób przedstawienia wszelkich danych tabelarycznych i spójna forma opisu stosowanych metod, a także fakt wyjątkowo starannie dopracowanej szaty graficznej, której elementy są nie tylko bardzo przejrzyste i komunikatywne ale również po prostu eleganckie. Staranność w przygotowaniu dysertacji widoczna jest także w całkowitym braku usterek edytorskich (dopatrzyłam się jedynie dwóch brakujących znaków).

Trudno mówić o największym osiągnięciu mgr Weroniki Jaroszewicz, gdyż wartość tej pracy polega właśnie na złożeniu wszystkich elementów, które wspólnie stanowią funkcjonalny system. Każdy z trzech celów pośrednich wskazanych przez Doktorantkę był istotny i konieczny dla zrealizowania ambitnego projektu. Podstawowe cele pracy zostały osiągnięte, i z całą pewnością stanowią solidną podstawę do dalszego udoskonalenia nowotworzonej platformy prezentowania białek na powierzchni bakteriofaga. Jak słusznie zauważyła Doktorantka warto byłoby przeprowadzić dalsze badania biologii bakteriofaga TP-84, w zakresie cech istotnych dla budowanego systemu.

Drobiazgowo przedstawianie wyników wszystkich eksperymentów, również każdego z tych dających wynik negatywny, podyktowane najpewniej rzetelnością Doktorantki, sprawia jednak wrażenie pewnego nadmiaru zbędnych danych. Na przykład, w podrozdziale 6.4.1 część A Ryciny 37 jest zupełnie niepotrzebna skoro jedyną dokonaną zmianą względem niezadawalającego wyniku było powtórzenie reakcji PCR. Nie mam innych uwag krytycznych do ocenianej pracy. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki pokazują trafność założeń i planowania badań, a liczne modyfikacje procedur wprowadzane w miarę pojawiających się trudności świadczą o dojrzałym podejściu Doktorantki do pracy naukowej.

W ostatnim, 10 rozdziale dysertacji, umieściła Doktorantka spis swojego dorobku naukowego, wykazując współautorstwo w kolejnych pięciu publikacjach naukowych (zarówno o charakterze eksperymentalnym jak i przeglądowym) oraz udział w 9 konferencjach o dosyć zróżnicowanej tematyce. Świadczy to dodatkowo o jej dużym doświadczeniu w pracy laboratoryjnej, pracowitości oraz zaangażowaniu we współpracę z innymi członkami zespołu.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszelkie ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz.U. z 2018 r. poz.1668) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim z dziedzin obejmujących nauki przyrodnicze. Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Jaroszewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "U Ziel". The signature is written in a cursive, somewhat stylized font.