

Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn  
Katedra Biologii Molekularnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 14 stycznia 2023 r.

Instytut Immunologii
Wpł. data 17-01-2023
L.dz. 13

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Pani mgr inż. Katarzyny Gembarcy**  
**pt. „Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej i identyfikacja epitopów**  
**antygenów bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała**  
**wybranych klas”**

Bakteriofagi, jako najliczniejsze na Ziemi obiekty biologiczne, obligatoryjne pasożyty komórek prokariotycznych, występują praktycznie we wszystkich możliwych środowiskach naturalnych, gdzie występują ich naturalni gospodarze. Jednym z tych środowisk jest organizm ludzki, w którym z kolei liczbę komórek bakteryjnych szacuje się na co najmniej zbliżoną do, jeśli nie większą od, liczby komórek budujących ciało człowieka. Nic zatem dziwnego, że ludzki wirom zawiera również bakteriofagi. Z drugiej strony, użycie bakteriofagów jest rozpatrywane jako alternatywna w stosunku do zastosowania antybiotyków terapia zakażeń bakteryjnych. W tym świetle pytanie o odpowiedź immunologiczną organizmu człowieka na obecność bakteriofagów jest zarówno bardzo zasadne, jak i niezmiennie ważne. Do tej pory badania w tym zakresie skupiały się nad określeniem takiej odpowiedzi w warunkach podawania jednego rodzaju bakteriofaga. Tego typu eksperymenty nie mogły dać jednak kompleksowej odpowiedzi na postawione pytanie, gdyż łatwo można było przewidzieć, co potwierdziły wyniki badań, że w przypadku każdego bakteriofaga odpowiedź immunologiczna jest inna.

---

Katedra Biologii Molekularnej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024  
fax. (58) 523 5501  
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59  
80-308 Gdańsk  
www.biology.ug.edu.pl

Pani mgr inż. Katarzyna Gembara za cel swojej pracy postawiła identyfikację epitopów antygenowych całej puli bakteriofagów przez układ immunologiczny człowieka, na podstawie przebadania surowic pochodzących od wielu osób. W tym celu podjęła się określenia jakie oligopeptydy pochodzące z wirionów bakteriofagowych są najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała klasy IgG obecne w surowicach 200 osób, z których 100 pochodziło z Polski a 100 ze Stanów Zjednoczonych Ameryki (USA). Zadanie to było zarówno bardzo ambitne i ważne naukowo, jak też równocześnie trudne. Jego realizacja wymagała z jednej strony zastosowania metod wielkoskalowych oraz zaawansowanej obróbki bioinformatycznej, a z drugiej opanowania nowoczesnych metod z zakresu mikrobiologii i genetyki molekularnej. Realizacja takich badań, aby była efektywna, musiała odbywać się z ośrodkiem naukowym mającym odpowiednią infrastrukturę oraz w zespole mającym duże doświadczenie w badaniach nad bakteriofagami oraz w zakresie funkcjonowania układu immunologicznego. Takie warunki znakomicie spełniały Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, jedna z wiodących jednostek naukowych w skali międzynarodowej, w której prowadzi się badania nad bakteriofagami oraz możliwościami ich używania w terapii, oraz osoba promotora rozprawy doktorskiej, Pani prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej, jednej z niewątpliwych światowych liderów w zakresie prac nad oddziaływaniem bakteriofagów z układem immunologicznym ssaków. Doktorantka znakomicie wykorzystała te warunki, przedstawiając niezwykle ciekawą i wartościową rozprawę doktorską.

Zaczynając badania, Pani mgr inż. Katarzyna Gembara postanowiła skorzystać ze zdeponowanych danych dotyczących genów bakteriofagowych i kodowanych przez nie produktów białkowych zaangażowanych w budowę wirionów. Przeprowadzone analizy pozwoliły na zaprojektowanie starterów umożliwiających stworzenie biblioteki zawierającej reprezentację potencjalnie wszystkich znanych białek strukturalnych bakteriofagów w systemie prezentowania peptydów na

powierzchni bakteriofaga T7 (tzw. „phage display”). Dysponując taką biblioteką, Autorka przeprowadziła reakcje immunoprecypitacji z użyciem surowic pochodzących od 100 osób z terenu Polski oraz 100 osób z terenu USA. Wyselekcjonowanie klonów pochodnych T7 eksponujących białka fagowe reagujące specyficznym z przeciwciałami zawartymi w surowicach dało możliwość ustalenia sekwencji nukleotydowych kodujących wspomniane białka. Mając taką bazę sekwencji, Pani mgr inż. Katarzyna Gembara mogła dokonać analiz częstości występowania białek fagowych, z którymi specyficznym reagują surowice ludzkie, co z kolei może świadczyć o częstości występowania odpowiednich bakteriofagów w organizmie człowieka. Co bardzo ciekawe – a dla mnie dość zaskakujące – oligopeptyd fagowy, który został rozpoznany przez przeciwciała zawarte w największej liczbie surowic, zarówno pochodzących od osób z populacji polskiej jak i amerykańskiej, był reprezentatywnym dla bakteriofaga Edugator, zakażającego bakterie z gatunku *Mycobacterium smegmatis*. W dalszej kolejności, często identyfikowanymi bakteriofagami były wirusy infekujące komórki *Erwinia amylovora* (to też zaskakujące, gdyż są to bakterie zakażające rośliny), *Escherichia coli* (tu już bez żadnych niespodzianek), *Pseudomonas syringae* i in. Co ciekawe, zestaw gatunków bakterii zakażanych przez zidentyfikowane bakteriofagi okazał się stosunkowo podobny w populacji polskiej i amerykańskiej, z tym, że w tej drugiej populacji występowało istotnie większe zróżnicowanie w obrębie rozpoznawanych przez przeciwciała sekwencji oligopeptydów fagowych. Ponadto, najczęściej rozpoznawane oligopeptydy reprezentowały białka wchodzące w skład ogonków bakteriofagów, co może sugerować ich większą immunogenność niż białek tworzących główki.

Powyżej opisane badania i analizy stanowią oczywiście tylko część wykonanych i opisanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Gembarcy prac, jednak wskazują na najważniejsze jej elementy. Podkreślić należy ogrom pracy włożony w te badania – myślę, że tylko osoby, które konstruowały kiedyś biblioteki w systemie „phage display” oraz wykonywały ich analizy mogą w pełni docenić jak

wielkim przedsięwzięciem były opisane badania. Niezależnie od tego, uzyskane wyniki są niezwykle cenne naukowo, gdyż po raz pierwszy pokazały na poziom zróżnicowania bakteriofagów, które mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną organizmu człowieka. Są to rezultaty bardzo ważne szczególnie dla przyszłego rozwoju terapii fagowej, w której oszacowanie efektywności tworzenia przeciwciał rozpoznających specyficzne bakteriofagi jest wyjątkowo istotne.

Podsumowując merytoryczną ocenę pracy chciałbym podkreślić, że Pani mgr inż. Katarzyna Gembara zaplanowała bardzo ambitne badania, wykonała je bardzo efektywnie i precyzyjnie oraz prawidłowo zinterpretowała uzyskane wyniki. Podkreślić należy biegłość Autorki w analizach bioinformatycznych a jednocześnie bardzo dobre opanowanie technik genetyki molekularnej, inżynierii genetycznej i mikrobiologii. Przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje zatem bardzo wysoki poziom merytoryczny, świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań przez Autorkę oraz niewątpliwie opisuje rozwiązanie problemu naukowego.

Oceniając stronę redakcyjną tej pracy, na wstępie trzeba stwierdzić, że w większości jest ona napisana poprawnym językiem naukowym. Wyniki badań są jasno przedstawione i zilustrowane. Wyciągnięte wnioski są klarownie zaprezentowane. Mimo to, mam pewne uwagi do sposobu zaprezentowania badań opisanych w rozprawie, wymienione poniżej:

1. Rozdział „Wstęp” rozpoczyna się od opisu systemów prezentacji peptydów na powierzchni wiorionów fagowych („phage display”). O ile jeden z takich systemów faktycznie był intensywnie wykorzystywany w tej pracy, to stanowił on jednak tylko narzędzie badawcze. Spodziewałbym się zatem, że rozdział wprowadzający do pracy będzie zaczynał się od przedstawienia głównego obiektu badań, czyli bakteriofagów występujących w organizmie człowieka oraz możliwości ich zastosowania w terapii fagowej, dalej wskazania na problem naukowy podjęty w pracy, a następnie opisu znanych dotychczas rezultatów prac

nad odpowiedzią immunologiczną ssaków na bakteriofagi. Poproszę zatem Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego przyjęła inną strategię przy pisaniu wstępnej części rozprawy doktorskiej i dlaczego uznała ją za lepszą od tej wyżej opisanej.

2. W opisie wyników badań brakuje krótkiego wprowadzenia do założeń każdego doświadczenia i przypomnienia na czym ono polegało. Autorka odsyła czytelnika do opisu materiałów i metod, ale jest to uciążliwe i powoduje rozpraszenie się na szukaniu odpowiednich informacji. Szczególnie widoczne jest to na przykład na stronie 85, w opisie rozdziału 5.5. Czytelnik jest zupełnie pogubiony w tym jakie surowice zostały użyte, na czym polegało doświadczenie, czemu miało służyć. Oczywiście wracając do opisów materiałów i metod, po głębszej analizie wszystko da się zrozumieć i praca faktycznie zawiera wszystkie niezbędne informacje, jednak ich układ może spowodować zniecierpliwienie albo zniechęcenie u czytelnika. Warto mieć zatem trochę litości dla czytelnika i zadbać o to, aby mógł płynnie przechodzić z rozdziału do rozdziału, bez konieczności „skakania” po całej rozprawie w celu znalezienia niezbędnych informacji.
3. To, że Doktorantka umie w ten sposób przedstawiać badania można stwierdzić czytając rozdział pt. „Dyskusja”. Jest tam zawarte jasne i bardzo sprawne przedstawienie założeń i celów pracy, tego w jaki sposób badania zostały przeprowadzone oraz jakie wnioski wyciągnięte. Wszystko to przedyskutowane w świetle dostępnej wiedzy. Dla przykładu, taki opis jak został przedstawiony na str. 109 (drugi akapit) powinien znajdować się w rozdziale „Wyniki” (nawet w skróconej wersji), przed pokazaniem uzyskanych rezultatów immunoprecypitacji. Wtedy czytelnik miałby jasny obraz doświadczeń i mógłby skupić się na analizie wyników.

4. Oprócz powyższych uwag redakcyjnych odnośnie układu rozprawy, mam jeszcze drobne uwagi o charakterze technicznym. Warto aby Autorka w przyszłości zwróciła uwagę na pewne szczegóły, jak na przykład to, że po tytule pracy nie stawia się kropki, a w opisie warunków wirowania, lepszą praktyką jest podawanie wartości g zamiast liczby obrotów na minutę (r.p.m.).

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr inż. Katarzyna Gembara wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła także, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń, przeprowadzenie analizy wyników oraz wyciągnięcie wniosków. Uzyskała bardzo istotne naukowo rezultaty doświadczeń, poprawnie je zinterpretowała i zaprezentowała uprawnione wnioski. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wymagania ustawowe dotyczące warunków jakie musi spełniać rozprawa doktorska. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Gembarzy do dalszych etapów procedury zmierzającej do nadania Jej stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę bardzo ważny naukowo temat pracy, opanowanie przez Doktorantkę różnorodnych metod badawczych, oraz dokonanie kompleksowej i zakrojonej na szeroką skalę (zapewne najszerszą z dotychczas przeprowadzonych na świecie) analizy odpowiedzi immunologicznej człowieka na obecność bakteriofagów, zwracam się z wnioskiem o rozważenie możliwości odpowiedniego wyróżnienia tej rozprawy doktorskiej.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn