

Dr hab. Magdalena Płotka
Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KATARZYNY GEMBARY ZATYTUŁOWANEJ:

„Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej i identyfikacja epitopów antygenów bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała wybranych klas”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Gembarcy została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej oraz Pana Prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Zawarte w rozprawie doktorskiej badania realizowane były w ramach dwóch projektów: Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach działania 3.2 Studia doktoranckie Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, POWR.03.02.00-I037/16-00, 01.04.2018-30.09.2023, „BioTechNan – Program Interdyscyplinarny Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii” oraz Narodowego Centrum Nauki OPUS 18 nr 2019/35/B/NZ7/01824 „PhageScan: identyfikacja epitopów bakteriofagowych mających istotne znaczenia dla zdrowia człowieka”.

Wyniki przedstawione w dysertacji zostały częściowo opublikowane w 2021 roku w czasopiśmie Current opinion in biotechnology w artykule przeglądowym zatytułowanym „Phage-specific antibodies” oraz przedstawione na międzynarodowej konferencji naukowej Viruses of Microbes (VoM 2022) „Serological profiling of humans and identification of epitopes in bacteriophages recognized by specific antibodies” mającej miejsce w lipcu 2022 r. w Guimarães w Portugalii. Warto podkreślić, że czasopismo Current opinion in biotechnology ma wysoki Impact Factor wynoszący obecnie 10.279. Duże wrażenie zrobił na mnie przegląd literatury ujęty w tej pracy („Phage-specific antibodies”), gdzie w Tabeli S1 suplementu (również Załącznik nr 1 niniejszej pracy) zawarte są dane dotyczące obecności przeciwciał specyficznych dla bakteriofagów po ich podaniu u ludzi i zwierząt. Tabela ta zawiera 174 pozycje literaturowe opublikowane na przestrzeni 63 lat (między 1956 – 2019 r.). Pani mgr Katarzyna Gembara wykazała się zatem niezwykłą znajomością podjętego tematu oraz dużą tzw. „wnikliwością naukową”.

Mgr Katarzyna Gembara oprócz wyżej wymienionej publikacji jest autorką kolejnych 6 prac opublikowanych w latach 2020-2022, które cytowane były 34 razy według bazy danych Web of Science (dane na dzień 10.02.2023). W mojej ocenie na tym etapie kariery zawodowej jest to znaczący dorobek naukowy.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez Panią magister Katarzynę Gembarę jest opracowaniem, które należy ocenić zdecydowanie pozytywnie. Jest to praca stanowiąca dowód biegłej orientacji Autorki w projektowaniu i prowadzeniu badań nad identyfikacją epitopów

bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała klasy IgG na poziomie populacji. Co więcej, podjęty temat jest niezmiernie aktualny i istotny dla rozwoju badań nad bakteriofagami czy terapią fagową.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Gembarzy została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych i obejmuje 150 stron. Cel pracy poprzedza obszerny, 28 stronicowy Wstęp, gdzie Autorka wyczerpująco przybliży technologię Phage display oraz zalety bakteriofaga T7 wykorzystywanego jako nośnik egzogennych genów. W Tabeli nr 2 wymienione są przykłady wykorzystania metody Phage display z użyciem bakteriofaga T7 jako, np. nośnika cząstek stymulujących odpowiedź immunologiczną. Kolejno Autorka wnikliwie opisuje podstawy metody VirScan jako nowatorskiego i wysokoprzepustowego podejścia pozwalającego na kompleksowe profilowanie serologiczne populacji. Autorka przybliży szereg najnowszych badań, w których metoda VirScan znalazła zastosowanie, takich jak choćby badania nad ostrym, wiotkim zapaleniem rdzenia kręgowego (AFM), gdzie wykazano obecność wysokich poziomów przeciwciał specyficznych dla entrowirusów innych niż polio w płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych, co wskazuje na ich rolę w etiologii AFM. W kolejnych podrozdziałach niezmiernie ciekawie mgr Gembara opisuje też fageom jelitowy i zmiany w obrębie fageomu, przykładowo u osób cierpiących na cukrzycę typu 2, czy u pacjentów ze spektrum autyzmu. Szereg najnowszych badań, w których zaobserwowano zmiany fageomu w różnych stanach chorobowych zostały wymienione w Tabeli nr 3. Kolejne podrozdziały wstępu układają się w logiczną całość, a Doktorantka płynnie przechodzi z opisu jednego zagadnienia do drugiego.

Niezmiernie ciekawym tematem, jasno opisanym przez Doktorantkę, są interakcje fagów z układem odpornościowym. Rodzaje przeciwciał indukowanych przez bakteriofagi są wyczerpująco opisane. **Mam jednak pytanie odnośnie wymienionych przez Doktorantkę białek fagowych: Hoc i głównego białka kapsydu (MCP) jako skutecznych induktorów przeciwciał IgG.** Pełna nazwa białka Hoc to Highly immunogenic outer capsid protein. Sama nazwa białka wskazuje na silną immunogenność. Na podstawie uzyskanych w pracy wyników Doktorantka wysnuwa wniosek niejako odmienny: to białka budujące strukturę ogonka fagowego są bardziej immunogenne niż składniki główki. Czy mogłabym poprosić Doktorantkę o komentarz w tej kwestii? Jednak to białka kapsydu są silniej eksponowane niż białka ogonka.

Istotne informacje i niewiadome dotyczące przeciwciał swoistych dla fagów są bardzo przejrzysto przytoczone w Tabeli nr 4. Cel pracy jest również jasno określony i szeroko opisany w kontekście bieżącej wiedzy dotyczącej bakteriofagów i ludzkiego układu odpornościowego. Bardzo podoba mi się wyszczególnienie przed Doktorantkę „luki” w badaniach nad bakteriofagami jaką jest brak kompleksowego określenia epitopów fagowych najczęściej rozpoznawanych przez ludzki układ odpornościowy. Bardzo ambitnym celem niniejszej pracy było wypełnienie tej luki z zastosowaniem

nowatorskiego podejścia jakim jest technologia VirScan połączona z sekwencjonowaniem nowej generacji. Bardzo pozytywnie odbieram też nawiązanie współpracy z prof. D. C. Nelsonem z University of Maryland, USA. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy nie zawężają się zatem tylko do populacji polskiej, ale mają także szerszy kontekst naukowy.

Sformułowane przez Autorkę cele zostały osiągnięte dzięki zastosowaniu właściwych metod badawczych detalicznie opisanych w rozdziale Metody. Wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzone z zastosowaniem odpowiednich reakcji kontrolnych. Na uwagę zasługuje zwłaszcza Rysunek 6, gdzie Autorka w przejrzysty sposób podaje schemat próby badanej oraz trzech prób kontrolnych zastosowanych w reakcji strącania epitopów bakteriofagowych za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich. Umieszczone w pracy wzory, rysunki, czy szczegóły techniczne wpływają na przeświadczenie o możliwości łatwego powtórzenia zastosowanej metodologii.

W rozdziale Wyniki Autorka opisuje amplifikację $2,8 \times 10^5$ oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych. Kolejno Autorka przybliży przygotowanie wyżej wymienionej biblioteki oligonukleotydów do klonowania, klonowanie do wektora T7Select415-1 i konstrukcję biblioteki rekombinowanych bakteriofagów T7 prezentujących na swojej powierzchni oligopeptydy bakteriofagowe. Kolejne rozdziały to detaliczny opis reakcji immunoprecypitacji, izolacji materiału genetycznego z immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych, przygotowanie materiału do sekwencjonowania NGS oraz opis samego sekwencjonowania. Podsumowując tę część rozprawy, badania zostały opisane w sposób wzorowy, nie pozostawiając recenzentowi dużego miejsca na wytknięcie błędów. Pracę czyta się płynnie, a Autorka dołożyła wszelkich starań, aby umieścić wszelkie szczegóły dotyczące dotychczasowych badań, tzw. obszarów niewiedzy, celów cząstkowych pracy, czy opisu wyników. **Drobne pytanie dotyczy tylko Tabeli 6 i kontroli 1 i 2 oznaczonych jako *. Co oznacza miano $4,5 \times 10^5$ PFU/ml oraz $5,0 \times 10^4$ PFU/ml?**

Najciekawszą część pracy stanowi jednak charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych oligopeptydów bakteriofagów. Najczęściej rozpoznany oligopeptyd bakteriofagowy zarówno w populacji polskiej jak i USA to ASR85707.1_oligopeptide_4 pochodzący z scaffolding protein bakteriofaga Edugator, którego gospodarzem jest *Mycobacterium smegmatis mc² 155*. Nie dziwi miejsce izolacji tego bakteriofaga (gleba) jednak częstsze rozpoznawanie tego oligopeptydu przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej (87,95%) vs do 46,75% osób płci męskiej zaskakuje. W rozdziale Dyskusja Autorka sugeruje obecność bogatszego fageomu u kobiet, jednak niektóre badania nie pokazują związku pomiędzy bioróżnorodnością mikrobiomu (a co za tym idzie fageomu), a płcią. **Czy możliwe jest zatem, że kobiety częściej chorują na zaburzenia układu pokarmowego co związane jest z rozszczelnieniem bariery jelitowej? Może to sprzyjać przedostaniu**

się bakteriofagów do płynów ustrojowych, a tym samym powodować zwiększoną odpowiedź immunologiczną. Czy mogłabym prosić Doktorantkę o komentarz?

Analiza uzyskanych wyników przedstawiona jest rzetelnie. Pani mgr Katarzyna Gembara w postaci dwóch tabel wymieniła oligopeptydy bakteriofagowe rozpoznawane przez przeciwciała klasy IgG w 30% badanych surowic w populacjach polskiej i USA. Przy pomocy programu BLAST odnalazła też sekwencje homologiczne pochodzenia bakteriofagowego lub bakteryjnego do najczęściej rozpoznawanych oligopeptydów bakteriofagowych. Wyniki analizowała pod kątem cyklu litycznego, czy lizogenego bakteriofaga (Rysunek 15), specyficzności bakteriofagów, z których pochodziły sekwencje oligopeptydowe najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała obecne w badanych surowicach (Rysunek 16), czy źródła izolacji bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd (Rysunek 17). Komentarz odnośnie białek bakteriofagowych, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów (Rysunek 18) zawarty jest w początkowej części recenzji. Autorka wysnuła też prawidłowy wniosek, że wykrywalna reaktywność surowic może być wynikiem ekspozycji osób nie tylko na jeden zidentyfikowany, ale na grupę szczepów bakteriofagów o zbliżonej charakterystyce molekularnej.

Dyskusja przeprowadzona jest poprawnie, w świetle dostępnej wiedzy na temat, przykładowo, różnorodności mikrobiomu ludzkiego w zależności od położenia geograficznego. Doktorantka prawidłowo przedstawia również ograniczenia wykorzystanej metodyki, na przykład identyfikację tylko epitopów o charakterze liniowym, bez uwzględnienia epitopów konformacyjnych.

Należy też podkreślić, że dużą część rozprawy doktorskiej stanowią materiały uzupełniające zawierające liczne tabele. Stanowią one obszerne źródło danych dotyczących charakterystyki zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów wraz z ich sekwencjami homologicznymi. Przedstawione w rozprawie analizy z pewnością były czasochłonne, a obszerna pula danych wymagała od Doktorantki dużych umiejętności analitycznych.

Podsumowując, Doktorantka w pełni zrealizowała postawiony cel pracy i przedstawiła pionierski spis istotnych populacyjnie epitopów bakteriofagowych. Identyfikacja bakteriofagowych oligopeptydów rozpoznawanych przez przeciwciała ludzkie może stanowić potencjalny cel planowych modyfikacji. Epitopy wysoce reaktywne mogłyby być zmieniane np. poprzez mutagenezę, czy dołączanie niereaktywnych elementów. Miałoby to szczególne znaczenie w terapii fagowej, gdzie reaktywne epitopy zmieniane byłyby na inne mniej immunogenne. Na podkreślenie zasługuje również fakt kontynuacji badań przez Doktorantkę i wykorzystanie dobrze poznanej metodologii do wykrywania epitopów z mutacjami, które umożliwiają bakteriofagom ucieczkę spod kontroli immunologicznej.

Czytając przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską nasuwa się jednak drobna uwaga. Doktorantka pisze, że fageomy osób chorych są inne niż osób zdrowych, a co za tym idzie przeciwciała

neutralizujące bakteriofagi są w tej grupie inne. Stwierdzenie to jest jak najbardziej poprawne, jednak Doktorantka wykorzystwała do badań surowice osób zdrowych. **Czy nie lepiej byłoby przebadać surowice od pacjentów z danymi jednostkami chorobowymi jeśli zgromadzona wiedza miałaby być przydatna w prowadzeniu skutecznej terapii fagowej?** Ponadto, istnieje pewna pula bakteriofagów wykorzystywanych terapeutycznie np. bakteriofagi z rodziny PB1. Zidentyfikowane w niniejszej pracy sekwencje reaktywnych oligopeptydów tylko w 2% pochodziły od bakteriofagów izolowanych ze środowiska szpitalnego. **Czy nie można by było przeprowadzić analizy bardziej ukierunkowanej, wykorzystując do przygotowania biblioteki *phage display* sekwencji tylko bakteriofagów o potencjale terapeutycznym?**

Te drobne uwagi nie umniejszają wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Gembarry. Została ona przygotowana niezwykle starannie i to zarówno pod względem edytorskim jak i graficznym. Przedstawione badania są opisane zwięzłym językiem naukowym. W pracy znajdują się drobne nieścisłości, jednak jest ich stosunkowo niewiele.

1. Podczas składania pracy doszło do zamiany stron i tak strona 22 jest przed stroną 21, czy strona 28 przed 27. Utrudnia to nieco czytanie pracy, zwłaszcza Wstępu.
2. W pracy znajduje się kilka błędów literowych np. ujawnił, nie ujawnij; strona 30
3. potencjał przeciwbakteryjny, nie przeciwbakteryjną; strona 43
4. podłoża LB, nie podłożu LB; strona 64
5. w żelu agarozowym, nie na żelu agarozowy; strona 83
6. nadreprezentowane w i ; strona 91
7. Powinno być: Załącznik 5, Załącznik 6, nie Tabela 5, Tabela 6; strona 110
8. różnic na poziomie, nie w na; strona 111
9. Surowice nie mogą być „ptci żeńskiej”; strona 113
10. Powinno być: ludzkiego antygeny leukocytarnego; strona 114
11. Niektóre identyczne publikacje w rozdziale Literatura wymieniane są dwa razy w różnym lub tym samym formacie np. Dabrowska K. i in., 2014 Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol* 88:12551-12557, strona 136; Deng X. i in., 2018 Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 714-720; Liu i in., strony 142, 143.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu bardzo wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pani mgr Katarzyny Gembarry oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1668), jak również Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 roku w sprawie

dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych – Dziennik Ustaw z 2018 roku, poz. 1818.

Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Gembarzy do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także ze względu na bardzo skrupulatnie przeprowadzone analizy i wyniki o dużym potencjale publikacyjnym wnoszę o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Gdańsk, 2023-02-15

UNIwersYTET GDAŃSKI
KATEDRA MIKROBIOLOGII



Dr hab. Magdalena Potka