



UNIwersytet  
Warszawski



Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej  
Dr hab. Monika Radlińska  
m.radlinska@uw.edu.pl

PAN - Instytut Immunologii  
08-03-2023  
Wpł. dnia .....  
L.dz. 76

Warszawa, 28.02.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Katarzyny Gembarcy pt. „Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej i identyfikacja epitopów antygenów bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała wybranych klas” (ang. *Serological profiling of human population and identification of epitopes in bacteriophage antigens most frequently recognized by specific antibodies of selected classes*).**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Katarzyny Gembarcy została wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej i prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza.

Narastająca antybiotykooporność patogennych bakterii narzuca konieczność poszukiwanie nowych rozwiązań stanowiących alternatywę dla antybiotyków. Wśród nich najczęściej rozważana jest terapia z użyciem bakteriofagów. W wielu ośrodkach na świecie prowadzone są badania i testy z użyciem fagów w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych. Pierwszym ośrodkiem fagoterapii w Unii Europejskiej i w zasadzie jedynym w Polsce, w którym prowadzone jest leczenie bakteriofagami u chorych zakażonych antybiotykoopornymi bakteriami, jest Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN (IITD PAN), chociaż leczenie to wciąż traktowane jest jako eksperymentalne. IITD PAN dysponuje metodami izolacji bakteriofagów oraz wytwarzania preparatów fagowych, stale prowadzi badania nad skutecznością fagoterapii i wpływem jaki ma ona na funkcjonowanie układu odpornościowego pacjentów leczonych fagoterapią.

Człowiek ma nieustanny kontakt z bakteriofagami, gdyż są one wszechobecne w środowisku oraz stanowią ważne składniki naturalnego mikrobiomu ludzi i innych zwierząt. Zarówno natywne, środowiskowe, jak i te bakteriofagi wprowadzane ludziom w celach terapeutycznych, wchodzą w interakcje z układem odpornościowym i są zdolne do wywoływania specyficznej produkcji przeciwciał. Może to rzutować na funkcjonowanie faga, rozwijać aktywności neutralizującą surowicy ludzkiej krwi, a to z kolei może mieć wpływ na efektywność zastosowanej fagoterapii. Zrozumienie naturalnych interakcji bakteriofagów z układem immunologicznym jest więc jedną z dróg, która może nas zbliżyć do ustalenia kluczowych warunków szerokiego zastosowania terapii fagami tj. jej

skuteczności i bezpieczeństwa. Rozprawa doktorska mgr Gembarę ściśle wpisuje się tę istotną, z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, tematykę.

Mgr Katarzyna Gembara stosuje w swoich badaniach jako narzędzie, wersję techniki VirScan, która umożliwiła w przeszłości detekcję, z wysoką rozdzielczością, przeciwciał przeciwwirusowych (przeciwko wielu typom wirusów), w oparciu o ich występowanie w próbce surowicy krwi, wykorzystując analizę oddziaływań epitop (pochodzenia wirusowego)-przeciwciała i włączając w to sekwencjonowanie najnowszej generacji. Ten zmodyfikowany protokół (nazwany PhageScan), wspomnianej wyżej metody, stanowi nowatorskie rozwiązanie, i został użyty do identyfikacji epitopów, znajdujących się w kapsydach różnych wirusów bakteryjnych przez specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko nim, znajdujące się w surowicy krwi ludzi zdrowych. Dzięki temu staje się możliwe wskazanie, które elementy kapsydów bakteriofagowych najczęściej i najsilniej oddziałują z ludzkim układem immunologicznym. Badania przeprowadzone przez mgr Gembarę są pierwszą próbą profilowania swoistości ludzkich przeciwciał przeciwwirusowych skierowanych na te, które infekują bakterie (czyli bakteriofagi).

## **OCENA PRACY**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim. Ma układ typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym w naukach biologicznych i pod względem swojej konstrukcji jest poprawna.

Rozprawa doktorska liczy 150 stron i zawiera 18 rycin (z czego 8 w części Wstęp) oraz 9 tabel (z czego 5 w części Wstęp). Składa się na nią 11 rozdziałów, w tym Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie (w j. polskim i angielskim), Bibliografia oraz Załącznik (większość materiałów wchodzących w skład Załącznika umieszczono na płycie CD). Tekst pracy poprzedzony jest Spisem treści, Spisem rycin, Spisem tabel, Wykazem zastosowanych skrótów, Spisem załączników oraz Informacją o tym, że materiały zawarte w dysertacji (i) zostały częściowo opublikowane w pracy przeglądowej, w której mgr Katarzyna Gembara jest współautorem (*Phage-specific antibodies*. Gembara K, Dąbrowska K. *Curr Opin Biotechnol*. 2021;68:186-192); (ii) były przedstawione jako doniesienie w formie plakatu na konferencji naukowej *International Scientific Conference: Viruses of Microbes* (2022); (iii) były realizowane w ramach dwóch projektów: NCBiR (2014-2020), OPUS18 NCN (od 2019). Bibliografia obejmuje ponad 140 pozycji literaturowych, przy czym co najmniej 5 z nich została, zapewne omyłkowo, dwukrotnie wymieniona w spisie.

**Tytuł pracy** „Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej i identyfikacja epitopów antygenów bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała wybranych klas” odpowiada treści pracy, a tą wybraną do analiz klasą są przeciwciała IgG.

**Wstęp pracy** liczy 27 stron, składa się z 5 podrozdziałów, w których przedstawiono kolejno zagadnienia takie jak: (i) założenia techniki *phage display* i systemy, które tę metodologię stosują; (ii) narzędzie VirScan stosowane do profilowania serologicznego; (iii) bakteriofagi jako naturalne składniki mikrobiomu ludzkiego oraz ich interakcje z układem odpornościowym; (iv) typy przeciwciał indukowanych przez fagi; (v) hipotezy i przypuszczenia związane z produkcją przeciwciał, jako skutku zastosowanej fagoterapii.

Ułożenie poszczególnych zagadnień jest klasyczne „od ogółu do szczegółu” i jest w tym wypadku jak najbardziej poprawne, gdyż stopniowo wprowadza czytelnika w omawianą tematykę. Podsumowując, Wstęp w sposób wyczerpujący prezentuje tematykę badawczą będącą przedmiotem dysertacji.

Mam sporo uwag do błędów językowych i merytorycznych we Wstępie, część zamieściłam na końcu recenzji, tu pozostawiłam cztery uwagi i proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

1. Jak należy rozumieć „dużą odporność bakteriofagów” dzięki której można przechowywać biblioteki bakteriofagowe przez długi czas. (s.19)
2. Jaka cecha (i dlaczego) zdecydowała o uznaniu sześciu białek faga T7 jako „głównych białek” („fag koduje ok. 50 białek, w tym sześć białek głównych”, s.21)
3. Jak należy rozumieć zdanie „Prezentacja dużej liczby białek fuzyjnych (tj. 415 kopii) na całej powierzchni kapsydu koreluje z dużą wydajnością klonowania i pakowania, co przekłada się na dużą wydajność biblioteki T7 *phage display*.” (s.21)
4. Na s. 34 opisano zmiany w fageomie u osób z cukrzycą w oparciu o dane literaturowe. Cytuję: **„Badania wykonane zostały w oparciu o sekwencjonowanie 16S rRNA w celu identyfikacji bakteriofagów** po izolacji VLP (cząstek wirusopodobnych) z próbek kału.” Analizy sekwencji genów kodujących 16S rRNA wykonuje się w celu analizy różnorodności bakterii w danej niszy ekologicznej, nigdy bakteriofagów (!). Bakteriofagi nie zawierają w swoich genomach genów kodujących rybosomalne RNA. A zatem jaki test do identyfikacji składu fageomu został użyty w cytowanej pracy Chen i in., 2021?

**Cel pracy.** Jako główny cel dysertacji mgr Gembara wskazała „identyfikację oligopeptydów pochodzenia bakteriofagowego najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała IgG na poziomie populacji, z użyciem prób pochodzących od zdrowych dawców reprezentujących populację polską oraz USA, samodzielnie wykonanej biblioteki *phage display*, immunoprecypitacji oraz identyfikacji sekwencji kodującej epitopy metodą NGS”. Uznaję ten cel za jasno określony oraz spójny z tytułem pracy oraz treścią dysertacji.

Jestem natomiast zaskoczona kolejnym zdaniem umieszczonym w rozdziale Cel pracy (s.47), w którym mgr Gembara podała jej **oczekiwany rezultat**. Chociaż faktycznie Doktorantka napisała „rezultaty projektu”, zapewne chodziło o rezultat realizacji dysertacji. Tym oczekiwanym rezultatem było (tu cytata) „utworzenie pierwszej bazy zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych (immunogennych grup fagowych i immunogennych białek fagowych) w kontekście całych puli fagowych (fageomów) występujących w organizmach ludzkich.” Niewykluczone, że jest to faktycznie oczekiwany rezultat projektu NCN OPUS18 pt. „PhageScan: identyfikacja epitopów bakteriofagowych mających istotne znaczenie dla zdrowia człowieka”, w ramach którego (jak wspomniano wyżej), prowadzone były badania mgr Gembarę, i że w przyszłości ten rezultat faktycznie uda się zrealizować, ale, w mojej opinii, takiego rezultatu w dysertacji nie otrzymano.

Jednakże, konsekwentnie mgr Gembara podaje podobną informację w **Streszczeniu** (s. 119). Tu wręcz stwierdziła, że „efektem realizowanego projektu jest pierwsza baza zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych (immunogennych grup fagowych i immunogennych białek fagowych) **w kontekście całych puli fagowych (fageomów) występujących w organizmach ludzkich.**” W mojej opinii jest to za daleko idący wniosek w ocenie osiągniętych własnych rezultatów. Źródłem danych, które posłużyły do otrzymania biblioteki oligonukleotydów były sekwencje bakteriofagów znajdujące się w bazie danych NCBI (z całą pewnością baza ta NIE zawiera pełnych danych o całej puli fagów obecnych w ciele człowieka). Sekwencje oligonukleotydów, które okazały się być rozpoznawane przez surowice ludzkie w przeprowadzonych testach, porównywano z bazą białek zgromadzoną w NCBI (która jak wspomniano wyżej z całą pewnością NIE zawiera pełnych danych o całej puli fagów obecnych w ciele człowieka). Czy i w jakim stopniu baza NCBI, wykorzystana jako punkt odniesienia w tej analizie, zawierała informacje o składnikach fageom w ciele człowieka, nie zostało w żadnym miejscu dysertacji podane, ani przedyskutowane. Żaden z oligonukleotydów nie był częścią białka faga zidentyfikowanego w mikrobiomie ani nie były nimi fagi, których białka wykazały podobieństwo do tych wyżej przywołanych (w każdym razie nie wspomniano o tym). Chce też podkreślić, że bardzo mi tego aspektu (tj. przedyskutowania uzyskanych rezultatów w kontekście całych puli fagowych występujących w organizmach ludzkich) brakowało. A zatem, jeśli, zdaniem Autorki, był to jeden z faktycznych celów tej dysertacji czy oczekiwanych rezultatów, brak takiej analizy i dyskusji wyników, uważam za poważne niedociągnięcie.

Cel pracy, chociaż jak napisałam wyżej jest klarownie i poprawnie określony, został poprzedzony półstronicowym wprowadzeniem, które, w mojej opinii, jest zupełnie w tym miejscu zbędne. Cel powinien być krótko sformułowany, a wszelkie wyjaśnienia, np. przyczyny podjęcia się danego problemu badawczego, powinny znaleźć się we Wstępie.

**Materiały.** Rozdział ten zawiera bardzo szczegółowy spis wykorzystywanych odczynników, sprzętów (aparatury), buforów oraz listę starterów do reakcji PCR.

**Metody.** W tym rozdziale mgr Gembara bardzo szczegółowo opisała procedury użyte w badaniach. Chociaż w opisach znalazły się tak dokładne dane jak liczba pipetowań mieszaniny reakcyjnej, czy pojemność użytej probówki etc., zabrakło w kilku miejscach kluczowych danych np. jakie było stężenie molowe wektora T7 w reakcji ligacji z oligonukleotydami tworzącymi bibliotekę (s.64). Podana objętość ( $\mu$ l) nic nie mówi o proporcjach tego DNA, w stosunku do ilości insertów (tu prawidłowo podano stężenie w pmol). A zatem, **w jakiej proporcji wektor:insert przygotowano tę reakcję?** Gdyby proporcje nie były właściwe, nie mogłaby powstać biblioteka zawierająca każdy zrekombinowany oligonukleotyd.

Nie znalazłam też informacji w jaki sposób otrzymano DNA fagowy, czy z biblioteki wyjściowej czy z puli fagów wyselekcjonowanych w wyniku immunoprecypitacji. Podrozdział 4.13 opisuje sam proces immunoprecypitacji, a 4.14 reakcję PCR, gdzie DNA fagowy jest używany jako matryca. Takiego opisu nie zawiera też podrozdział 4.16, chociaż w podrozdziale Wyników 5.6 można znaleźć zdanie „Izolację DNA z immunoprecypitowanej części biblioteki (..) wykonano zgodnie z procedurą 4.16”. Podrozdział 4.16 opisuje tylko sam etap oczyszczania DNA po dodaniu barkodów aby przygotować go do sekwencjonowania NGS”. A zatem, **jak otrzymano matrycowy fagowy DNA**, który później użyto do PCR (innymi słowy – jak zostały otwarte kapsydy)?

Niezwykle zaciekała mnie obecność EDTA w reakcjach PCR (np. s 71 czy 72), zazwyczaj obecność EDTA jest traktowana jako zanieczyszczenie. Dodanie EDTA zaleca producent kitu do PCR, więc nie wątpię, że ten krok jest prawidłowy ale ciekawi mnie po prostu przyczyna dodawania EDTA w tych protokołach.

**Wyniki i Dyskusja.** Rozdział Wyniki liczy 28 stron, ale jego znaczącą część tworzą tabele numer 3, 5-7 umieszczone (ze względu na obszerność) w Załączniku. Rozdział Dyskusja ma 9 stron, dodatkowo Autorka umieściła oddzielnie **Wnioski końcowe**.

W oparciu o analizę bioinformatyczną bakteriofagowych białek strukturalnych zaprojektowano 56-aminokwasowe oligopeptydy, które zostały następnie zaprezentowane na powierzchni eksperymentalnej platformy jakimi były kapsydy zrekombinowanych bakteriofagów T7, dzięki zastosowaniu techniki *phage display*. Oczywiście uprzednio mgr Gembara uzyskała dzięki klonowaniu zrekombinowane wektory fagowe, wprowadziła je do kapsydów, namnożyła zrekombinowane bakteriofagi, a następnie zageściła je do wysokiego miana. Uzyskaną bibliotekę bakteriofagów prezentujących testowane epitopy, Doktorantka użyła następnie do analizy 200 surowic ludzi zdrowych (po 100 z populacji polskiej i USA). Dzięki zastosowaniu immunoprecypitacji wyodrębniła te zrekombinowane cząstki fagowe, które połączyły się z reagującymi z nimi przeciwciałami IgG znajdującymi się w surowicy. Sekwencje nukleotydowe kodujące reaktywne epitopy poznano dzięki sekwencjonowaniu NGS. Warto podkreślić, że tylko

jedno z pięciu sekwencjonowań NGS zostało wykonane przez serwis zewnętrzny, pozostałe wykonała Doktorantka. Na podstawie analiz statystycznych (porównanie sekwencjonowania immunoprecypitowanych bibliotek z wyjściową) wskazano 245 oligopeptydy reaktywne, z których 67 dokładniej scharakteryzowano. Charakterystyka, oprócz podstawowych opisów (nazwa natywnego białka, z którego pochodzi oligopeptyd, nazwa faga kodującego to białko, miejsce jego izolacji etc.), zawierała analizy porównawcze np. określono które fagowe białka strukturalne najczęściej zawierały zidentyfikowane epitopy reaktywne. Natomiast przeszukanie bazy NCBI pozwoliło Doktorantce na identyfikację podobnych białek (fagowych czy bakteryjnych), które wykazały co najmniej 50% identyczność sekwencji aminokwasowej z reaktywnymi epitopami. Taka analiza może sugerować „popularność”, bądź „unikatowość” danego epitopu, przynajmniej w puli znanych białek. W tym miejscu chciałabym wyrazić żal, że z analiz wyłączono sekwencje białek eukariotycznych. Zakładam, że wśród nich były też białka wirusów eukariotycznych, chociaż nie zostało to podane. Znalezienie fragmentu białka eukariotycznego, w szczególności wirusowego, podobnego do sekwencji epitopu fagowego mogłoby wskazać innego „winowajcę” obecności przeciwciał neutralizujących w surowicy (innego niż fagi). To nie umniejszałoby absolutnie uzyskanego przez Doktorantkę rezultatu, ale dodałoby dodatkowego wymiaru analizie.

Mgr Gembara we **Wnioskach** końcowych wskazała cztery, jej zdaniem najistotniejsze: (i) surowica ludzka zawiera całą gamę przeciwciał rozpoznających epitopy białek fagowych; (ii) profile serologiczne populacji zamieszkujących inne regiony geograficzne są różne; (iii) więcej zidentyfikowanych epitopów reaktywnych miały fagi wirulentne niż łagodne; (iv) najwięcej epitopów reaktywnych lokowało się w białkach ogonka niż główki kapsydu. Te wnioski uważam za słusznie wybrane i właściwie podsumowujące badania zaprezentowane w dysertacji. Jednocześnie chcę podkreślić, że założony **Cel pracy** został osiągnięty.

Podsumowując, uważam, że badania przedłożonej dysertacji są bez wątpienia nowatorskie, a ich rezultatem jest szereg interesujących wyników, które będą dobrym punktem wyjścia do bardziej szczegółowego profilowania swoistości ludzkich przeciwciał przeciw białkom bakteriofagowym. **Za najbardziej wartościowy wynik, z punktu widzenia zarówno poznawczego jak i aplikacyjnego uważam** to, że jest to „pierwszy spis istotnych populacyjnie epitopów”, który może być użyty do „sprawdzenia czy identyczne lub bardzo podobne oligopeptydy są obecne w innych bakteriofagach” – kandydatach do fagoterapii, i oceny prawdopodobieństwa ich neutralizacji przez przeciwciała obecne w surowicy pacjenta.

Analiza przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów, wniosków wysuwanych przez nią na poszczególnych etapach oraz dyskusji uzyskanych rezultatów, nasunęła mi się szereg pytań, które zamieszczam poniżej. Bardzo proszę mgr. Katarzynę Gembarę o ustosunkowanie się do nich:



**1) Ile genomów fagowych znajdowało się w bazie NCBI w dniu pobrania danych tj. 1.06.2018?**

Z ilu z tych fagów pobrano anotowane otwarte ramki odczytu? Bardzo często zdarza się, że białko fagowe znajdujące się w bazie, nie ma przypisanej funkcji (bo nie wskazała jej osoba submitującą sekwencję danego faga do NCBI, czy nie wskazał jej sam serwis), a powodem mógł być brak danych eksperymentalnych, brak podobieństwa do znanych białek i inne. A zatem takie białka, które chociaż (realnie) pełnią funkcje strukturalne, ale nie zostały anotowane, zostałyby, jak sądzę, pominięte w analizie. Czy tak się stało? **Z ilu zatem fagów faktycznie „zaciągnięto” dane w stosunku do całkowitej liczby fagów w bazie tego dnia?**

**2) Jeśli wybrano do badań (ściślej do zaprojektowania oligonukleotydów) wyłącznie anotowane ORF (czyli takie które zawierały słowa klucze wymienione na s.58) to dlaczego znalazły się w zestawie także białka o nie przypisanej funkcji np. *hypothetical protein* SEA\_YEEZY\_7 kodowane przez faga *Gordonia Yeezy*?**

**3) Ile oligonukleotydów kodujących oligopeptydy zostało zsyntetyzowanych przez firmę Agilent?** W Załączniku nr 3 wyraz „*oligopeptide*” występuje 347 648 razy, co by oznaczało, że taką liczbę oligonukleotydów zaprojektowano, czy tak faktycznie było? Jeśli tak, to dlaczego wielkość biblioteki określono na  $2,8 \times 10^5$  (s. 81), czyli o ponad 67600 oligonukleotydów mniejszą?

**4) Z opisu procedury *phage display* nie wynika aby przeprowadzono więcej niż jeden raz etap panningu („wzbogacanie powinowactwa”). Zazwyczaj (bio)panning powtarza się kilkakrotnie aby uzyskać większe powinowactwo (lepszą selekcję poszukiwanego celu). Dlaczego więc w tym wypadku był tylko jeden etap?**

**5) Czy dla wybranych (np. najlepszych) epitopów planuje się indywidualne testy sprawdzające czy faktycznie reagują z surowicą, jeśli użyje się je oddzielnie, w formie czystej, a nie jako część biblioteki. Rozumiem, że taki test wymagałby uprzedniego, oddzielnego przygotowania takiego epitopu, tym niemniej uzyskany rezultat byłby bardziej wiarygodny. Przy okazji warto byłoby sprawdzić sześć epitopów, które razem z 31 innymi oligopeptydami zostały „odrzucone” z wyjściowej biblioteki, bo były nadreprezentowane. Takie indywidualne sprawdzenie w teście z surowicą ,mogłoby wykazać, że są właściwymi trafieniami.**

**6) Wysokość miana fagów wyjściowej biblioteki jest dla mnie niejasna. Na s.84 podano, że wynosiła ona  $5,5 \times 10^9$  PFU/ml po namnożeniu. W kolejnym podrozdziale pojawia się informacja o mianie biblioteki przed i po koncentracji  $8,3 \times 10^9$  oraz  $3,9 \times 10^{10}$  PFU/ml. A na kolejnej stronie w opisie immunoprecypitacji (s. 85, Tabela 6) podano, że miano biblioteki na starcie (przed immunoprecypitacją) wynosiło  $8,4 \times 10^{10}$  PFU/ml. A zatem która z tych liczb jest prawdziwa? Co stanowiło tzw. kontrolę (na dole tabeli 6 pojawia się informacja o użyciu dwóch „Kontroli”)?**

**7) Na podstawie jakiego eksperymentu ustalono, że każdy klon biblioteki faga T7 (przypuszczam, że chodzi o pojedynczy prezentowany epitop) jest reprezentowany ilością  $2 \times 10^5$  (Metody 4.13; s.69)?**

**Kluczowymi wynikami** w dysertacji, są w mojej opinii, te, które wskazują które epitopy fagowe są immunoreaktywne. Ich wskazanie to, jak twierdzi Autorka, wynik przeprowadzonej analizy statystycznej porównania sekwencjonowania biblioteki fagowej, przed i po immunoprecypitacji. Jest to właściwe podejście, ale zostało ono po prostu podane jako informacja, natomiast nie dostarczono czytelnikowi szczegółowych danych, które pozwoliłyby na ocenę wiarygodności przeprowadzonej procedury analitycznej (tj. czy została ona przeprowadzona zgodnie z zasadami). Na przykład co kryje się pod określeniem „statystycznie znamienne wzbogacony” (s. 110)? Jeśli jakieś dane zostały uzyskane dzięki analizie statystycznej to ta analiza powinna być dostarczona. Ze względu na brak tych szczegółowych informacji, do tej części pracy mam najwięcej zastrzeżeń i pytań. A zatem proszę mgr Gembarę o ustosunkowanie się do nich:

**1) Jaka była jakość biblioteki wyjściowej** (przed immunoprecypitacją)? Sugestia, że nie była ona najlepsza jest informacją od samej Autorki, że biblioteka wyjściowa była sekwencjonowana aż 45 razy, w normalnej sytuacji byłoby to niepotrzebne.

**2) Jaka była liczba odczytów każdej z sekwencji kodującej oligopeptyd** w każdym sekwencjonowaniu (ściślej: jaki był statystyczny rozrzut liczby wystąpień danej sekwencji)? **Ta informacja jest absolutnie kluczowa** ponieważ była punktem odniesienia, w celu określenia potencjalnego „wzbogacenia”, w bibliotekach uzyskanych po kontakcie z surowicą (immunoprecypitowanych). Ile było powtórzeń zwanych technicznymi, czy były jakieś powtórzenia biologiczne i na czym polegały?

**3) Jak głęboko zostały zsekwencjonowane biblioteki po immunoprecypitacji?** Jaka była liczba odczytów każdej z sekwencji kodującej oligopeptyd, która w tej „wzbogaconej” bibliotece się znalazła? Jak napisałam wyżej – nie przedstawiono graficznie porównania wyników sekwencjonowania przed (biblioteka wyjściowa) i po immunoprecypitacji. Najlepszy byłby wykres pokazujący jaka była krotność podbicia (wielkość zmiany) oraz jego statystyczna istotność, czyli *fold-change versus p-value*. Zdaję sobie sprawę, że tych danych jest bardzo dużo, ale wizualizację na przykład można by zrobić z użyciem wykresu wulkanu (ang. *volcano plot*), który jest używany w eksperymentach omicznych. To rodzaj wykresu rozrzutu, który pokazuje istotność statystyczną (wartość *p*) w funkcji wielkości zmiany (krotności zmiany), ale zapewne mogą być użyte inne sposoby wizualizacji. W każdym razie prosiłabym mgr Gembarę o przedstawianie tych brakujących danych podczas publicznej obrony.

Pozostałe moje uwagi do części Wyniki i Dyskusja, proszę mgr Gembarę o ustosunkowanie się do nich:

- Jak duża liczebnie była ostatecznie badana populacja – czyli liczba użytych w analizach surowic? Wyjściowo było ich 200, ale chyba ze względu na problemy z jakością sekwencjonowania 40 bibliotek wycofano. Czy to co pozostało reprezentowało 80 osób z Polski i 80 z USA?



- Oligonukleotyd uznawano za immunoreaktywny jeśli był wzbogacony u co najmniej 5% populacji. A zatem był immunoprecypitowany u co najmniej 4 osób, jeśli przyjąć że grupa badana to 80 osób. Nie znalazłam stosownego odniesienia, dotyczącego zastosowania takiego odcięcia, w publikacji Xu i in. 2015, na którą powołuje się mgr Gembara.

- W wielu miejscach dysertacji (także w Wynikach i Dyskusji) pojawia się informacja, że bakteriofagi mogą namnażać się w komórkach bakterii wykorzystując dwa zupełnie różne cykl infekcyjne (rozwojowe) – lityczny i lizogeny. Uważam, że jest to błąd merytoryczny. Po pierwsze **każdy** aktywny (niedefektywny) wirus bakteryjny przeprowadza cykl lityczny. Tylko efektem cyklu litycznego jest powstanie cząstek potomnych, a zatem propagacja wirusa. Niektóre fagi mogą dodatkowo podążyć ścieżką (cyklem) lizogennym, kiedy to genom faga staje się częścią genomu bakteryjnego gospodarza. Ale to sposób na przetrwanie, a nie ścieżka prowadząca do propagacji – owszem materiał genetyczny faga jest replikowany wraz z genomem jego gospodarza, ale nie następuje kolonizacja nowego gospodarza (komórki potomne to w zasadzie klonalni „bracia i siostry” pierwotnego gospodarza). Zdecydowanie lepszymi określeniami są te, używane w odniesieniu do samych fagów: fag wirulentny (zdolny do przeprowadzenia wyłącznie cyklu litycznego) oraz fag łagodny (zdolny do przeprowadzenia zarówno cyklu litycznego, jak i lizogenego).

W odniesieniu tej kwestii do tematu dysertacji – wpływu fagów łagodnych, które lizogenizują ludzki mikrobiom, na układ odpornościowy uważam, że ewentualny kontakt z nim może nastąpić w zasadzie wyłącznie jako konsekwencja zakończonego cyklu litycznego zaindukowanego profaga. Profagi to formy latentne („uśpione”) i ich geny nie podlegają ekspresji (a już na pewno nie ulegają ekspresji geny kodujące białka późne, w tym strukturalne), dlatego jest mało prawdopodobny bezpośredni kontakt białek strukturalnych takiego faga (bo nie powstają) z układem odpornościowym. Ilościowo, cząstek fagów łagodnych jest oczywiście dużo mniej w organizmie ludzkim, niż fagów wirulentnych, bo nie są one w stanie namnożyć się efektywnie, bo nie mają wokół siebie wrażliwych gospodarzy (bo ci potencjalni gospodarze są lizogenami, niemożliwymi do superinfekcji). A zatem otrzymany rezultat, że mniej jest w organizmie człowieka przeciwciał skierowanych przeciwko fagom łagodnym można uzasadnić nie „częstszymi kontaktami układu odpornościowego z fagami lizogennymi” (jak napisała Autorka), ale wręcz przeciwnie - z powodu znikomego kontaktu z nimi.

- Niezależnie od wniosku, który zamieściłam powyżej, tak naprawdę nie jest dla mnie jasna ewentualna korelacja obecności określonych białek strukturalnych w kapsydzie a faktem czy dany fag jest łagodny czy wirulentny. Wydaje mi się (ale jeśli się mylę, bardzo proszę Doktorantkę o przytoczenie odpowiednich danych eksperymentalnych), że nie stwierdzono konserwacji ewolucyjnej jakiś foldów czy konkretnych białek, które występowałyby tylko u którejś z tych grup (tj. tylko u fagów łagodnych albo tylko u fagów wirulentnych). Nie znajduję uzasadnienia

fizjologicznego dla takiej konserwacji. Natomiast byłaby ciekawa, w mojej opinii, analiza czy immunoreaktywne epitopy częściej występowały u fagów o pewnej morfologii kapsydu np. tych, które mają długie ogonki (myowirusy i siphowirusy), a rzadziej u tych o bardzo krótkich ogonkach (podowirusy), albo bezogonkowych (*Microviridae*). Bo przecież, Doktorantka wykazała, że najczęściej rozpoznawanymi oligopeptydami fagowymi były te budujące ogonek lub płytkę podstawową.

- Lizogenia **nie** jest uznawana za „chroniczne zakażenie” (s.113) – to również błąd merytoryczny. W chronicznym zakażeniu wirus się stale namnaża tj. powstają cząstki potomne wirusa. W przypadku lizogenii, jak napisałam wyżej, nie ma to miejsca, chyba, że zaindukowany profag wejdzie w cykl lityczny. Określenie „chroniczne zakażenie” używa się często do fagów nitkowatych np. M13, które stale się namnażają w zakażonej komórce (a zatem nie są lizogenami), ale jej nie lizują podczas wyjścia.

W przedłożonej dysertacji zabrakło mi kilku możliwych do przeprowadzenia analiz porównawczych czy rozważań w formie dyskusji. Zauważyłam na przykład (Tabela 3), że immunoreaktywnymi okazał się więcej niż jeden epitop wchodzące w skład tego samego białka fagowego (np. 3 epitopy w białku AKU42946.1). Wśród zidentyfikowanych epitopów chyba nie ma żadnego budującego kapsyd faga CrAss, który jest wskazywany jako najliczniejszy wśród fageomu ludzkiego, czy *Gubaphages*. Czy są jakieś dane literaturowe wskazujące na produkcję przeciwciał (lub brak takiej produkcji) przeciwko nim?

Nie pojawiła się w żadnym miejscu dysertacji refleksja, że być może zidentyfikowane immunoreaktywne epitopy występują na kapsydach nieznanych nam fagów (tworzących ludzki fageom), a fakt, że epitopy te wchodzą w skład znanego białka strukturalnego np. faga Edugador *Mycobacterium smegmatis* mc2, jest tylko koincydencją. A zatem uzyskany rezultat – stwierdzenie obecności przeciwciał przeciwko temu epitopowi nie wynikałoby z (ewentualnego) rozpowszechnienia samego bakteriofaga Edugador w środowisku i/lub jego gospodarza, tylko kontaktów układu odpornościowego człowieka z tym, nieznanym dotąd nauce, fagiem. Absolutnie nie umniejszam tu znaczenia uzyskanych danych, które uważam za bardzo wartościowe. Tylko w mojej opinii **najważniejszym jest określenie samej sekwencji immunoreaktywnego epitopu** (a jakie ma to znaczenie dla fagoterapii Doktorantka bardzo dokładnie opisała w dysertacji). Natomiast źródło tej sekwencji (konkretny fag, jego gospodarz, miejsce izolacji etc.), ma znaczenie drugorzędne lub żadne, bo może to być, jak podałam wyżej – koincydencja. Jest to wysoce prawdopodobne, w świetle mozaikowej budowy genomów fagowych i rekombinacji jako źródła ich zmienności.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę, że tekście dysertacji znajdują się błędy edytorskie (na przykład nieprawidłowe odsyłacze do podrozdziałów), usterki gramatyczne, składniowe i stylistyczne oraz lapsusy językowe. Wymienię kilka z nich:

- „Wektory bakteriofagów filamentowych cechują się ograniczoną **zdolnością** klonowania” (s.22). „Zdolność” w języku polskim oznacza określoną cechę człowieka, jego właściwość intelektualną.
- „Jest to związane z jego nielityczną propagacją, czyli eksportem wszystkich składników cząstki faga przez wewnętrzną błonę bakteryjną. „ (s.22). Nielogiczny związek przyczynowo skutkowy.
- „wewnętrzna błona bakteryjna”. Błąd merytoryczny. Bakterie mają jedną błonę - nazywaną komórkową (cytoplazmatyczną). Tzw. „błona zewnętrzna” to część ściany komórkowej bakterii gramujemnych (nie występuje u bakterii gramododatnich).
- „tworzenie szlaku przez zewnętrzną błonę komórki” – patrz wyżej. I czym jest ten „szlak”? Może chodziło o kanał.
- „W wypadku kiedy nie zostanie zastosowane projektowane klonowanie w ustalonych miejscach restrykcyjnych, dwie trzecie egzogennych genów w bibliotekach jest wstawianych z genem białka płaszcza faga poza ramką odczytu, co skutkuje wyświetlaniem losowych fragmentów peptydów, które nie są kodowane przez dołączony gen.” (s.23) Nie rozumiem tego zadania i związku przyczynowo skutkowego.
- „skrajnie wcześniaki” s.30. ??

Realizując pracę doktorską mgr Katarzyna Gembara wykorzystwała różne metody badawcze, takie jak: klonowanie i analiza rekombinantów, namnażanie bakteriofagów i ustalanie ich miana, procedura *Phage display*, immunoprecypitacja surowicą ludzką, sekwencjonowanie DNA metodą NGS. Analiza dotychczasowego dorobku mgr Gembarę wskazuje, że swoje umiejętności techniczne Doktorantka wykorzystwała podczas realizacji także innych projektów badawczych, bo oprócz wspomianej pracy przeglądowej, jest współautorką 6 publikacji, które ukazały się w uznanych czasopismach.

Na zakończenie muszę podkreślić, że moja ogólna ocena przedłożonej pracy doktorskiej jest pozytywna. Niewątpliwie stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Większość moich krytycznych komentarzy dotyczyła kwestii edytorskich, organizacji treści czy wizualizacji wyników sekwencjonowania, w tym analiz statystycznych. Zakładam, że te dane są w dyspozycji Autorki i zostaną przedstawione podczas obrony, zakładam też, że nie będą miały wpływu na merytoryczną wartość rozprawy, nie podważą uzyskanych wyników i poprawności ich interpretacji. Wymienione

uchybień oraz prośbę o uzupełnienie danych przytaczam z obowiązku recenzenta, po prostu uważam, że dla klarownego obrazu osiągnięcia, są one niezbędne.

Podsumowując, dysertację mgr Gembarę należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganiem stawianym rozprawom doktorskim.

## WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do recenzji praca **spełnia wymogi** określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. **o stopniach naukowych i tytule naukowym** oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2018.1669) z późn. zm. **i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Stanowi też dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę prac naukowych w zakresie biologii molekularnej i immunologii. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN o dopuszczenie magister Katarzyny Gembarę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Radlińska*