



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej, Instytutu Mikrobiologii  
PROF. DR HAB. ŁUKASZ DZIEWIT



Warszawa, 14.02.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr WERONIKI JAROSZEWICZ pt. „Konstrukcja nowego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84”

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Jaroszewicz została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego.

OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa została napisana w języku angielskim oraz języku polskim i ma układ nietypowy dla większości prac dyplomowych, a ta nietypowość polega na braku standardowego wprowadzenia, a w zamian umieszczeniu pracy przeglądowej, której Doktorantka jest pierwszą autorką. Bardzo podoba mi się to rozwiązanie. Publikacja pt. „Phage display and other peptide display technologies” została opublikowana w prestiżowym piśmie *FEMS Microbiology Reviews*. Oświadczenia współautorów jasno wskazują, że Doktorantka odegrała kluczową rolę w przygotowaniu manuskryptu, a wspomniana publikacja stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki poruszonej w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska liczy 155 stron i zawiera liczne ilustracje oraz tabele. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i językowym, a moje uwagi w tym zakresie są raczej niewielkie, np. (i) przy kolejnym użyciu nazwę rodzajową możemy skrócić, np. *E. coli* zamiast *Escherichia coli*), (ii) zwyczajowo stosuje się skróty dwuliterowe dla oporności kodowanej na plazmidach – Tabela 1, (iii) literówki - „z dołączonym 9 nukleotym linkerem” (strona 90). Tego typu pomyłki są nie do uniknięcia i nie wpływają one na moją całościową ocenę tej pracy.

Tytuł pracy „Konstrukcja nowego systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84” jest sformułowany poprawnie i dobrze odpowiada treści pracy.

Cel główny i cele dodatkowe pracy doktorskiej zostały sformułowane w sposób jednoznaczny i zrozumiały. Główny cel pracy to skonstruowanie systemu prezentowania białek/peptydów na powierzchni termofilnego bakteriofaga TP-84. Trzy cele dodatkowe mają charakter bardziej roboczy i odnoszą się do poszczególnych etapów prac.

Kolejny rozdział – Materiały i Metody – jest napisany w sposób bardzo szczegółowy, ale zrozumiały. Mnogość opisanych technik badawczych świadczy o doskonałym przygotowaniu metodologicznym Doktorantki, jej pracowitości i biegłości w pracach z zakresu biologii molekularnej.

Rozdział Wyniki i Dyskusja rozpoczyna się od krótkiego uzasadnienia dla prowadzonych prac badawczych. Autorka wskazuje, że wszystkie dotychczas skonstruowane systemy prezentacji białek/peptydów na powierzchni fagów, opierają się na zastosowaniu wirusów infekujących bakterie mezofilne, przez co mają istotne ograniczenia, np. problemy z prezentacją hydrofobowych peptydów

lub agregacja rekombinowanych białek. Doktorantka wskazuje, że opracowywany przez nią termofilny system prezentacji białek/peptydów może stać się istotną alternatywą, i że umożliwiłaby on m.in. prezentację termostabilnych peptydów/białek. Taki wstęp wydaje mi się niezwykle istotny dla przejrzystości opisu w rozprawie.

W sekcji tej widać, że Doktorantka podjęła się ogromnej pracy z zakresu biologii molekularnej tworząc bardzo liczne i trudne konstrukty, a przede wszystkim przeprowadzając żmudne optymalizacje, co zajęło jej za pewne niemało czasu. Niemniej jednak, muszę przyznać, że niepotrzebnym wydaje mi się używanie stwierdzeń typu „sprawdzałam bardzo dużo kolonii z płytek po transformacji” czy „po wielu kolonijnych PCR” – owszem podkreśla to ogrom pracy, ale wszyscy naukowcy, którzy kiedykolwiek pracowali w laboratorium biologicznym, doskonale zdają sobie sprawę, że realizacja wielu założeń badawczych jest bardzo trudna lub po prostu się nie udaje i jest to jak najbardziej naturalne. Poza tym sformułowania „dużo/wiele” są subiektywne oraz nieoczywiste i należałoby się ich wystrzegać w pracach naukowych. I wreszcie, jest to element fabularyzowania wypowiedzi, co nie do końca wpisuje się trendy pisania prac naukowych, które powinny pozostawać obiektywne w przekazie.

Rozdział Podsumowanie jest bardzo dobrym pomysłem, szczególnie mając na uwadze wielowątkowość tej pracy i liczne opisy niepowodzeń. Autorka w 7 punktach wymieniła główne osiągnięcia i wyniki swojej pracy, przy czym, według mnie, za najważniejsze należy uznać: (i) konstrukcję biblioteki natywnej oraz biblioteki genów fuzyjnych kodujących wybrane białka strukturalne faga TP-84 z dołączonymi fragmentami DNA kodującymi odpowiednie znaczniki molekularne; (ii) skuteczną transfekcję protoplastów *Geobacillus stearothermophilus* 10 materiałem genetycznym bakteriofaga TP-84, zarówno w formie natywnej jak i rekombinowanej; (iii) uzyskanie aktywnych cząstek fagowych posiadających fuzyjny gen 12 kodujący główne białko kapsydu faga TP-84 połączone ze znacznikiem molekularnym FLAG eksponowanym na zewnątrz wirionu.

#### KOMENTARZE, PYTANIA I ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Po przeczytaniu przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące komentarze/pytania/zagadnienia do dyskusji, proszę więc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

1. Strona 53 (sekcja Materiały i metody). Nie spotkałem się z określeniem „konserwa szczepu bakteryjnego”. Czy to określenie standardowo używane w mikrobiologii czy raczej „slang” laboratoryjny? Czy dobrze rozumiem, że chodzi tu po prostu o próbkę przechowywaną w głębokim zamrożeniu?
2. Doceniam wagę optymalizacji technik dla rozwoju nauki, ale uważam, że ich nadmierne eksponowanie w pracy doktorskiej jest niewłaściwe. Jaki był cel Doktorantki, aby tak szczegółowo opisywać prawdopodobnie wszystkie przeprowadzone badania, nawet te, które można by śmiało nazwać „ślepyimi uliczkami”, np. opis testowania markera wielkości na stronie 117? Wydaje mi się to zbędne.
3. W pracy zdarzają się określenia zapożyczone ze slangu laboratoryjnego, np. „Prążki widoczne w okolicach 5000 pz to prawdopodobnie niezligowane fragmenty (...)” – określenie „w okolicach” odnosi się raczej do miejsca/lokalizacji, ale nie koniecznie „miejsca” na żelu. Należy się wystrzegać tego typu sformułowań.

4. Jako potencjalny powód niepowodzenia klonowania w wektorze pBAC-lacZ Doktorantka wskazuje, że być może sam wektor BAC lub produkty genów TP-84 były toksyczne dla komórek *E. coli*. O ile produkty genów TP-84 rzeczywiście mogłyby być toksyczne dla tego gospodarza, to jednak toksyczność wektora wydaje mi się mało- lub nieprawdopodobna. Niemniej jednak zainteresowała mnie ta hipoteza i prosiłbym o rozwinięcie wątku. Czy istnieją jakieś dane literaturowe na ten temat? A może Doktorantka ma na to jakieś dowody?

5. Doktorantka wskazuje również, że powodem niepowodzeń mogła być wielkość wstawek – to rzeczywiście jest częste wytłumaczenie, powszechnie stosowane w laboratoriach. Jaki może być jednak tego mechanizm, tzn., dlaczego większe wstawki miałyby się klonować gorzej? Czy może mieć to związek z biologią wektora do klonowania (np. typu origin replikacji)?

#### WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim na podstawie art. 190 ust. 3 oraz art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Praca doktorska mgr Jaroszewicz świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym i praktycznym Doktorantki jako biologa molekularnego. Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Weroniki Jaroszewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Łukasz Dziewit