



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71
<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

dr hab. Kazimiera Waśniowska, prof. PAN
Zakład Immunochemii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu

Wrocław, 21.11.2014 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Justyny Bazan pt. „Badania nad adhezją cząstek fagowych do receptorów na komórkach bakteryjnych” wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Andrzeja Gamiana

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Justyny Bazan pt. „Badania nad adhezją cząstek fagowych do receptorów na komórkach bakteryjnych” podejmuje interesujący i oryginalny temat, poszerzający naszą wiedzę o właściwościach białek adhezyjnych wybranych bakteriofagów i ich oddziaływaniach z receptorami obecnymi na komórce bakteryjnej. Temat pracy jest bardzo ważny i aktualny, o dużych walorach poznawczych i praktycznych.

Praca doktorska mgr Justyny Bazan liczy 183 strony: w tym 143 strony to tekst rozprawy ilustrowany 10 tabelami i 46 rycinami oraz 30 stron to aktualne piśmiennictwo (318 pozycji). Pozostałe strony zajmują streszczenie pracy po polsku i angielsku, spis tabel i rycin oraz spis publikacji doktorantki związanych z tematyką rozprawy. Praca doktorska ma ogólnie przyjęty dla rozpraw doktorskich układ rozdziałów i ma zachowaną proporcję pomiędzy rozdziałami.

Rozdział „Wstęp” składa się z pięciu rozdziałów i kilku podrozdziałów, których treści są adekwatne do zamierzeń części doświadczalnej. W pierwszej części Doktorantka przedstawia aktualną wiedzę o budowie ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, rodzinie *Enterobacteriaceae* i możliwościach leczenia bakteryjnych zakażeń jelitowych. W następnych rozdziałach scharakteryzowane są właściwości bakteriofagów i mechanizm ich oddziaływania z bakteriami oraz omówione jest zastosowanie bakteriofagów w diagnostyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych. Jest on dobrze skonstruowany i napisany jasno i czytelnie, co świadczy o doskonałej znajomości aktualnego piśmiennictwa, dużej wiedzy i dobrym przygotowaniu do podjętych badań.

Głównym celem pracy, podanym jasno w osobnym rozdziale, było badanie oddziaływań wirionu bakteriofagowego z receptorami bakteryjnymi i opracowanie warunków identyfikacji fagowych białek adhezyjnych rozpoznających receptory bakteryjne.

Do realizacji celów pracy doktorskiej Doktorantka stworzyła różnorodny warsztat badawczy. Można wyróżnić kilka głównych grup stosowanych technik molekularnych: i) metody ekstrakcji i oczyszczania białek błonowych, LPS i cząstek bakteriofaga, ii) metody wykrywania, rozdzielania i analizy białek i LPS (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, immunobloting, dot bloting), iii) metody pracy z komórkami i bakteriofagami, v) wyrafinowane metody instrumentalne (spektrometria masowa, powierzchniowy rezonans plazmonowy) oraz metody mikrobiologiczne. Większość metod opisano dokładnie podając pochodzenie odczynników i wyszczególniając stosowaną aparaturę.

W pierwszej części wyników autorka dokonała charakterystyki 14 izolatów bakteryjnych *E. coli* wyizolowanych od chorych zwierząt hodowlanych i patogennego dla ludzi szczepu *E. coli* (PCM 2674) i przeprowadziła analizę cukrowa polisacharydów LPS-ów oczyszczonych z badanych izolatów *E. coli*. Do badania oddziaływań fag-bakteria wybrano układ bakteriofag O19 i szczep bakteryjny PCM 2674 i dokonano charakterystyki wybranego modelu badawczego. Kolejna, bardzo ciekawa, część wyników rozprawy dotyczy oddziaływań bakteriofag-bakteria.

Do najważniejszych osiągnięć doktorantki można zaliczyć:

- ✓ Klasyfikację faga O19 i wykazanie, że należy on do tej samej rodziny co dobrze poznany fag T4
- ✓ Określenie budowy i wielkości faga O19
- ✓ Opracowanie metody oczyszczania frakcji białek faga O19 zawierających adhezyne zdolną do oddziaływania z receptorem bakteryjnym i wykorzystanie oczyszczonych preparatów adhezyn znakowanych fluorescencyjnie do badania oddziaływań fag-bakteria i wykazanie, że w cząsteczce LPS, z adhezyną faga oddziałuje O-antygen. Te wyniki mogą być punktem wyjścia do opracowania testu diagnostycznego służącego do wykrywania receptorów bakteryjnych
- ✓ Zastosowanie LPS znakowanego biotyną do identyfikacji białek faga w blotingu i wskazanie na lokalizację adhezyn faga O19 w regionie płytki podstawowej i ogonka bakteriofaga.

Otrzymane wyniki doktorantka poddała krytycznej i wielopłaszczyznowej dyskusji w odniesieniu do wyników własnych oraz uzyskanych przez innych autorów. Wykazała się przy tym bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa i szeroką wiedzą w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością obiektywnej oceny wartości własnych badań.

Wnioski kończące pracę wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają postawionym celom.

Uwagi odnośnie edycji pracy:

Autorka umieściła tytuły tabel pod, a nie jak jest przyjęte nad tabelami, do czego czytelnik jest przyzwyczajony, w spisie treści pominięto ważny dla pracy rozdział „Streszczenie”, doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów gramatycznych (np. pisane oddzielnie niezaadsorbowane).

Uwagi odnośnie metodyki pracy:

- ✓ Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób przygotowywano próbki do analizy proteomicznej? Opis metody podany na str.62 jest zbyt ogólny.
- ✓ Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób usuwano detergent z badanych próbek? (Str. 57 6.3.1. „Detergent z próby usuwano przez dodanie do próby kwasu trójchlorooctowego w stężeniu końcowym 12,5%.”)
- ✓ Jaka była wydajność metody oczyszczania białek faga ?

Pracę oceniam bardzo wysoko, a wszelkie drobne uchybienia, wynikające z braku doświadczenia w pisaniu prac, wydają się nieistotne.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to praca oryginalna, solidnie wykonana, zawierająca istotne elementy nowości naukowej. Wyływające z badań Doktorantki wnioski mogą w znaczący sposób przyczynić się do wykorzystania adhezyn fagowych jako nowoczesnych markerów w diagnostyce zakażeń bakteryjnych. Doktorantka wykazała wszechstronną znajomość omawianych zagadnień, samodzielność myślenia oraz bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego. Biorąc pod uwagę aktualność tematu, wartość poznawczą pracy, staranną dokumentację wyników badań, z których część została już opublikowana stawiam wniosek o **wyróżnienie pracy**.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Bazan spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z późn.zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kazimiera Waśniowska