

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Darii Artyszuk

pt. „O antigen structural studies and O loci identification of nontypeable clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*” (Badania strukturalne antygenów O i identyfikacja loci O nietypowalnych izolatów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*)

Praca doktorska została przygotowana pod opieką promotora prof. dr hab. inż. Jolanty Łukasiewicz w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Klebsiella pneumoniae jest Gram-ujemną bakterią oportunistyczną, która stanowi naturalną florę skóry, jamy ustnej i jelit u człowieka. Po wnikięciu do organizmu bakteria może wykazywać wysoki stopień zjadliwości. U pacjentów z obniżoną odpornością gatunek ten może powodować poważne choroby, m.in. zapalenie płuc, infekcję dróg moczowych, zapalenie wątroby czy posocznicę. W związku z powyższym istotnym problemem są zakażenia szpitalne *K. pneumoniae*, związane m.in. ze stosunkowo łatwym rozprzestrzenieniem się i infekowaniem pacjentów o obniżonej odporności. Zapalenia płuc wywoływane w warunkach szpitalnych przez *K. pneumoniae* stanowią ok. 10% wszystkich zakażeń szpitalnych w państwach UE. Kolejnym problemem jest zwiększająca się oporność bakterii na dostępne antybiotyki. W powszechnym obiegu pojawiło się pojęcie superbakterii, czyli szczepów bakterii, które rozwinęły oporność na działanie lecznicze wielu antybiotyków powszechnie stosowanych w medycynie. Bakterie *K. pneumoniae* zazwyczaj są odporne na penicyliny, ze względu na wytwarzanie beta-laktamaz. Często generują tzw. beta-laktamazy o poszerzonym spektrum działania, w wyniku czego stają się odporne na penicyliny, cefalosporyny i monobaktamy. Jednym z ostatnio zbadanych mechanizmów oporności jest wytwarzanie karbapenemaz, które mają zdolność do dezaktywacji penicylin, cefalosporyn oraz karbapenemów. Bakterie *K. pneumoniae* NDM-1, produkujące rozkładający karbapenemy enzym New Delhi metallo-beta-lactamazę-1, zaliczane są do wspomnianych superbakterii. Bakterie chorobotwórcze dysponują szerokim spektrum czynników zjadliwości, które umożliwiają im m.in. infekowanie gospodarza, ochronę przed jego systemem odpornościowym, czy wywoływanie

chorób. Do najważniejszych czynników należą: fimbrie, siderofory, enzymy oraz polisacharydy - polisacharydy kapularne (CPS) i lipopolisacharydy (LPS).

Ze względu na oporność na antybiotyki, zjadliwość i ograniczone możliwości terapeutyczne, bakterie *Klebsiella pneumoniae* stanowią i w najbliższym czasie będą stanowiły poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W związku z powyższym bardzo ważne jest poszukiwanie alternatywnych, w stosunku do antybiotykoterapii, sposobów leczenia, a najlepiej zapobiegania chorobom powodowanym przez bakterie. Wydaje się, iż takim sposobem jest stosowanie odpowiednich szczepionek. Do ich produkcji wykorzystywane są antygeny o zdefiniowanej strukturze chemicznej. W przypadku bakterii ważne są antygeny znajdujące się na powierzchni ściany komórkowej, m.in. antygeny kapsularne oraz antygeny O (OPS). Oprócz struktury chemicznej antygenów ważna jest również wiedza na temat dystrybucji różnych serotypów (O lub K) wśród izolatów klinicznych.

W opisaną problematykę doskonale wpisuje się praca doktorska mgr Darii Artyszuk poświęcona m.in. badaniom strukturalnym antygenów O, pochodzących z nietypowalnych izolatów klinicznych *K. pneumoniae*. Przeprowadzone badania były częścią projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. "Nietypowalne antygeny O *Klebsiella pneumoniae* - struktura i seroepidemiologia".

Recenzowana praca liczy 121 stron, została napisana w języku angielskim w klasyczny sposób. Rozpoczyna się od dobrze opisujących zawartość rozprawy streszczeń w języku polskim i angielskim oraz wykazu stosowanych skrótów.

Kolejnym rozdziałem jest liczący 21 stron **Introduction**. W pierwszej części Doktorantka charakteryzuje bakterie *K. pneumoniae*, poświęcając dużo uwagi ich występowaniu, chorobotwórczości, zagrożeniom wynikającym z nabywanej oporności na antybiotyki, czy też alternatywnym metodom leczenia chorób wywoływanych przez te mikroorganizmy lub ich zapobiegania. W drugiej części mgr Daria Artyszuk dużo miejsca poświęca czynnikom wirulencji wytwarzanym przez opisywane bakterie, do których należą: fimbrie, białka błony zewnętrznej, siderofory, CPS-y oraz LPS-y. Przybliży również strukturę chemiczną jednostek powtarzalnych antygenów O należących do 11 serotypów oraz opisuje klastry genów związane z syntezą antygenów O. W trzeciej części Kandydatka opisuje aktualny stan wiedzy dotyczący strategii mającej na celu zapobiegania lub leczenia infekcji powodowanych przez bakterie *K. pneumoniae*. Tematyka poruszona w tym rozdziale jest ściśle związana z badaniami opisanymi w dalszych częściach rozprawy doktorskiej i stanowi bardzo dobre do nich wprowadzenie. Fragment ten napisany jest bardzo przystępnie i zawiera liczne, poprawnie dobrane, odnośniki literaturowe.

Cele badawcze zdefiniowane zostały w rozdziale **Aims of the study**. Ogólnym celem pracy doktorskiej było zbadanie jedenastu klinicznych izolatów *K. pneumoniae* (BIDMC 7B, ABC152, ABC122, BC738, BC13-986, 3936/19, Kp164, Kp165, Kp166, Kp174, Kp177) pod kątem obecności nowych serotypów O (struktur antygenów O) lub nowych modyfikacji strukturalnych antygenów O. Szczepy do badań zostały wybrane na podstawie braku oddziaływań LPS-ów z dostępnymi specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko znanym strukturom antygeny O lub zaobserwowanymi różnicami w *locus* O. Szczegółowe cele badań obejmowały:

1. określenie struktur chemicznych antygenów O wyizolowanych z wybranych jedenastu szczepów *K. pneumoniae*,
2. sekwencjonowanie genomów i analiza *loci* O kodujących antygeny O za pomocą narzędzi bioinformatycznych,
3. określenie częstości występowania nowych serotypów O lub ich modyfikacji w oparciu o dostępne bazy genomów *K. pneumoniae*.

W rozdziale **Materials and Methods** Doktorantka przedstawiła część doświadczalną rozprawy doktorskiej. Bardzo szczegółowo opisała hodowlę bakterii, wyodrębnianie LPS-ów i OPS-ów, analizy chemiczne i genomiczne, wykorzystywany sprzęt oraz oprogramowanie. Czytając ten fragment ma się wrażenie, że powtórzenie wszystkich eksperymentów i odtworzenie uzyskanych wyników nie powinno stanowić żadnego problemu. Ten dosyć oczywisty fakt wymaga jednak podkreślenia, ponieważ obecnie (niestety) nie jest to standardem w pracach doktorskich, czy nawet publikacjach naukowych.

Rozdział 8 (**Results**) liczy 38 stron, na których przedstawiono wyniki badań. Fragment ten został napisany bardzo dobrze. Wzbogacony jest licznymi rysunkami i wykresami, które ilustrują i zdecydowanie ułatwiają zrozumienie całego procesu analitycznego. Naturalną kontynuacją przedstawionych wyników badań jest rozdział **Discussion**, w którym Doktorantka wyniki swoich badań porównuje z aktualnymi doniesieniami literaturowymi. Opis ten jednoznacznie świadczy o bardzo dobrej orientacji mgr Darii Artyszuk w uprawianej tematyce naukowej. Podsumowując ten fragment pracy należy stwierdzić, że wszystkie postawione cele badawcze zostały przez Doktorantkę zrealizowane, a efektem przeprowadzonych badań są bardzo ciekawe wyniki, na podstawie których można wyróżnić dwa istotne osiągnięcia naukowe.

1. Zaproponowanie nowego serotypu O13, do którego zostały zaliczone izolaty: ABC122, BC738, BC13-986 i 3936/19. Rozszyfrowanie *locus* OL101 poprzez wyjaśnienie struktury chemicznej antygeny O - β -Kdop-(2→[→3)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-Glcp]_n. Ponadto wykazanie, że serotyp O13 jest dosyć licznie reprezentowany w gatunku (6,55% z 71377 genomów).

2. Wyjaśnienie różnic w serotypowaniu izolatów *K. pneumoniae* BIDMC 7B i ABC152 - analizy strukturalne wykazały serotyp O2v1, natomiast wyniki genotypowania opartego na Kaptive wykazały serotyp O2v2. Problem spowodowany był inaktywacją genu glikozylotransferazy GmlB w wyniku obecności sekwencji insercyjnej ISR1. Modyfikacja powodowała biosyntezę struktury O2v1 zamiast O2v2 i była przyczyną rozbieżności między fenotypem antygenu O a przewidywaniem *locus* O.

Należy wspomnieć jeszcze o dwóch innych osiągnięciach, zapewne nie tak istotnych jak wymienione powyżej, ale ważnych ze względów poznawczych i porządkujących stan wiedzy.

3. Przypisanie, na podstawie wyników analiz strukturalnych i genetycznych, izolatów Kp164, Kp165 i Kp166 (uznanych za nietypowe na podstawie porównania z nieprawidłowym szczepem referencyjnym) do znanego wcześniej serotypu O4.
4. Stwierdzenie na podstawie wyników badań, że izolaty Kp174 i Kp177 produkują szorstki LPS (pozbawiony OPS), co jest naturalnym procesem zachodzącym u bakterii, na przykład w wyniku wielokrotnego przesiewania kultur w laboratorium.

W podsumowującym rozdziale **Conclusions** w 6 punktach zawarto najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Kolejne rozdziały obejmują zestawienie wykorzystanej literatury (120 odnośników) i zamieszczonych w pracy rysunków i tabel (odpowiednio 37 i 15).

Rozprawa zakończona jest informacjami o osiągnięciach naukowych Doktorantki. Mgr Daria Artyszuk jest pierwszą współautorką 3 artykułów, w tym 2 oryginalnych, zawierających wyniki badań naukowych będące postawą recenzowanej rozprawy doktorskiej:

1. Artyszuk D, Izdebski R, Maciejewska A, Kaszowska M, Herud A, Szijártó V, Gniadkowski M, Lukasiwicz J. The Impact of Insertion Sequences on O-Serotype Phenotype and Its O-Locus-Based Prediction in *Klebsiella pneumoniae* O2 and O1. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(18):6572.
2. Artyszuk D, Jachymek W, Izdebski R, Gniadkowski M, Lukasiwicz J. The OL101 O antigen locus specifies a novel *Klebsiella pneumoniae* serotype O13 structure. *Carbohydr. Polym.* 2024, 326, 121581.

Ponadto Kandydatka jest współautorką 5 doniesień konferencyjnych zaprezentowanych na międzynarodowych sympozjach naukowych oraz stypendystką wspomnianego wcześniej projektu OPUS finansowanego ze środków NCN.

Rozprawę przeczytałem z dużą przyjemnością. Jest ona napisana logicznie, formatowanie tekstu jest bardzo dobre, a także należy pochwalić świetny pomysł z drukiem dwustronnym. Jednak

przy taki obszernym opracowaniu trudno jest ustrzec się drobnych pomyłek lub opisując skrótowo pewne treści wywołać zaciekawienie recenzenta. Poniżej przedstawiam kilka wybranych uwag.

1. S. 59. Pod tabelą jest opis „H1,C1=175 Hz and 170 Hz...”. Zapewne chodzi o stałe sprzężenia. Czy te wartości, a zwłaszcza wartość 175 Hz do czegoś były wykorzystane?
2. S. 66. Co oznaczają i na ile poprawne są wyrażenia „deoxy protons”? i dalej S. 72 „exocyclic CH₃ group”?
3. S. 70, Rys. 19. Zapewne przyporządkowanie do szeregów konfiguracyjnych jest właściwe, ale czy można byłoby zrobić coś jeszcze, żeby mieć „absolutną pewność” i przekonać recenzenta (niedowiarka)?
4. S. 70. O co chodzi we fragmencie dotyczącym wykorzystania acetonu D6 i D5?
5. S. 73. Struktura chemiczna jednostki powtarzalnej antygeny O wyizolowanego ze szczepu ABC122 jest stosunkowo prosta. Natomiast „umiejscowienie” reszty Kdo w tej strukturze było sporym wyzwaniem. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka z tym problemem poradziła sobie doskonale. Nasuwa się jednak pytanie - w analizowanym LPS-ie powinna (chyba) być część korowa, a w niej reszty Kdo. Czy m.in. charakterystyczne sygnały (C3/H3) nie powinny być widoczne na widmach?
6. Kontynuując wątek Kdo. Czy wiadomo w jakim celu bakterie modyfikują „koniec antygeny O”, np. resztą Kdo? Co ma miejsce np. w utworzonym serotypie O13.

I drobniutki techniczno-edytorskie.

1. Zestawienie stosowanych skrótów jest zdecydowanie konieczne, ale czy potrzebne jest rozwijanie dosyć (chyba) oczywistych np. USA?
2. S. 31. Rys. 3 jest dosyć oryginalnym podejściem i wydaje się prawidłowy. Ale klasyczne podejście, czyli „antygen O po lewej, a lipid A po prawej”, lepiej oddaje zasady przedstawiania struktur chemicznych sacharydów i ich połączeń z innymi klasami związków chemicznych.
3. Historia badań strukturalnych antygenów O bakterii *K. pneumoniae* moim zdaniem zasługuje na trochę więcej miejsca. Czyli Rys. 6 mógłby być trochę większy, a przez to czytelniejszy.
4. S. 55. Opis widm a-d trochę nieszczęśliwie zasłania „najważniejsze sygnały na widmie”.
6. S. 91 i 96. Błędne odniesienia do Tab. 15 i nie istniejącej Tab. 16.
6. Powszechne stosowanie w wartościach liczbowych przecinków zamiast kropek.

I pytanie/komentarz natury ogólnej.

Zdecydowana większość wyników prezentowanych w pracy została wcześniej opublikowana. Czy nie rozważano przygotowania pracy w formie hybrydowej? tzn. zgodnie z ustawą „zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych” uzupełnionego pozostałymi wynikami badań?

Wszystkie powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie pomniejszają bardzo dużej wartości poznawczej i potencjalnie aplikacyjnej rozprawy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o strukturach antygenów O bakterii *Klebsiella pneumoniae* i kodujących je klastrach genów. Większość uzyskanych wyników została opublikowana, a część z nich stanowiła podstawę do utworzenia nowej serogrupy O13. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane. Bardzo sprawnie posługuje się metodami chemicznymi, technikami separacyjnymi i spektroskopowymi oraz nowoczesnymi narzędziami analizy genetycznej.

Reasumując, przedłożona do oceny praca doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Darii Artyszuk do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz opublikowanie części z nich w bardzo prestiżowym czasopiśmie (*Carbohydrate Polymers*) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z. Kaczyński