



Wrocław, 29-02-2024

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Darii Artyszuk pt.
„Badania strukturalne antygenów O i identyfikacja *loci* O nietypowalnych izolatów
klinicznych *Klebsiella pneumoniae*”**

Klebsiella pneumoniae (pałeczka zapalenia płuc) jest klinicznie ważnym oportunistycznym patogenem powodującym różnego rodzaju zakażenia w tym głównie układu oddechowego, układu pokarmowego, kości, stawów czy układu moczowego prowadząc czasami do sepsy. Patogen ten oznaczony jest przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako priorytetowy ze względu na jego multilekową oporność i ograniczoną możliwości walki z nim metodami farmakologicznymi. Z tego względu opracowywane są nowe strategie terapeutyczne przeciwko infekcją tego patogenu jak i rozwijane są narzędzia do monitorowania szczepów klinicznych. Jedno z podejść terapeutycznych bazuje na aktywnej i pasywnej immunizacji przeciwko głównym antygenom powierzchniowym t. j. antygenowi K oraz O. Właśnie w ten nurt badań wpisuje się recenzowana praca doktorska poświęcona badaniom strukturalnym antygenów O a także identyfikacji O *loci* nietypowalnych izolatów klinicznych tejże bakterii. Praca została wykonana w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN po kierunkiem Pani prof. dr hab. Jolanty Łukasiewicz. Praca doktorska pani Darii Artyszuk jest przykładem bardzo dobrze wykonanej pracy z pogranicza immunologii, biologii strukturalnej cukrów oraz genetyki. Stanowi ona kontynuację wieloletnich badań prowadzonych przez zespół prof. Łukasiewicz.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska ma charakter rozprawy choć mogłaby być tzw. „spinką” ze względu na ilość opublikowanych artykułów, t. j. dwie prace eksperymentalne i jedna praca przeglądowa - wszystkie pozostające w temacie pracy doktorskiej. Rozprawa została napisana w języku angielskim i liczy 121 stron. Przygotowana jest w klasycznym stylu prac eksperymentalnych i w związku z tym zawiera wstęp teoretyczny, cele pracy, część materiałową i metodologiczną, rezultaty badań, dyskusję otrzymanych wyników oraz wnioski końcowe czyli konkluzję, a także cytowaną literaturą stanowiącą 120 pozycji. Na początku rozprawy dołączony jest spis używanych skrótów, niezwykle przydatny przy czytaniu lektury ze względu na ich ogromną ilość. Ponadto, w końcowej części pracy znajduje się suplement, w którym podane są linki do tabel zawierających dużą ilość danych. Linki te *de facto* stanowią suplement dwóch opublikowanych prac eksperymentalnych, których Doktorantka jest współautorką. Poza suplementem Pani Artyszuk umieściła w pracy również spis przygotowanych ilustracji, tabel oraz listę swoich osiągnięć publikacyjnych czy informację o aktywności konferencyjnej i grantowej.

Wstęp pracy liczący 18 stron jest zwięzłym rozdziałem zawierającym według mnie wszystkie niezbędne informacje konieczne dla zrozumienia poruszanych w pracy zagadnień, jej celu jak i wyników. W rozdziale tym Autorka scharakteryzowała po krótku bohatera pracy czyli bakterię *Klebsiella pneumoniae* pod kątem różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami patogennymi wyizolowanymi w różnych częściach świata i opisanymi w literaturze. Z zawartych we wstępie informacji jasne jest, że to powierzchnia polisacharydowa bakterii jest głównym celem rozwoju szczepionek kierowanych przeciwko temu patogenowi. Najważniejsza i najdłuższa część wstępu odnosi się właśnie do budowy ściany komórkowej, a dokładniej do czynników wirulencji zlokalizowanych w tejże ścianie, t.j. fimbriom, białkom błony zewnętrznej (OMP), eksporterom, sideroforam (znajdującym się w komórce a usuwanym na zewnątrz w celu transportu żelaza), a dokładniej ich receptorom, policukrom otoczki (CPS) będących antygenem K oraz lipopolisachardom (LPS) będącym głównym celem badań. W związku z tym Doktorantka szczegółowo opisała budowę LPS-ów kładąc szczególny nacisk na strukturę i podział O-specyficznych

polisacharydów (antygen O) a także na klaster genów koniecznych do produkcji tegoż antygeny. Szczególnie ciekawy i dojrzały jest tu opis powstałych wcześniej i aktualnie opracowywanych strategii terapeutycznych kierowanych względem antygeny O. Wskazując na braki w badaniach poszczególnych O serotypów oraz na problemy w serotypowaniu izolatów klinicznych, Doktorantka w kolejnym rozdziale w sposób zrozumiały definiuje cel swojej pracy, którym jest wyznaczenie kompletnej struktury antygenów O wyizolowanych z 11 izolatów klinicznych, analiza O *loci* kodujących O antygen przy zastosowaniu sekwencjonowania całego genomu i narzędzi bioinformatycznych a także określenie częstości występowania poszczególnych O serotypów i ich modyfikacji.

W kolejnej części swojej rozprawy Autorka w sposób skompresowany ale zarazem wystraszająco szczegółowy przedstawiła materiały, a przede wszystkim metody badawcze wykorzystywane w trakcie realizacji swoich badań. Moim zdaniem wachlarz jak i zakres stosowanych prac jest dość imponujący gdyż obejmuje wiele, mocno różniących się od siebie dziedzin jednocześnie t. j. hodowla bakteryjna, izolacja i rozdział produktów hydrolizy LPS-ów, zastosowanie szeregu eksperymentów NMR, analiza składu i podstawień w wielocukrach, ustalanie konfiguracji L/D cukrów, pomiary spektrometrii mas, metody elektroforetyczne i chromatograficzne, analiza sekwencjonowania całych genomów czy zastosowanie szeregu narzędzi bioinformatycznych celom porównawczym. Wskazuje to na szeroką wiedzę i umiejętności Doktorantki, a także na multidyscyplinarność całej pracy. Zastosowanie tak licznych metod badawczych wymagało zaangażowania sporej grupy badaczy, będących choćby współautorami opublikowanych prac i których Autorka nie wyszczególnia w swojej rozprawie. W związku z tym proszę o jasną prezentację wkładu Doktorantki czy innych autorów w poszczególne pomiary czy analizy.

Opis swoich badań Autorka rozpoczęła od izolacji LPS-ów oraz badań wstępnych nad nimi t. j. od analizy porównawczej widm ^1H HR-MAS NMR wyizolowanych LPS-ów do widm zarejestrowanych znanych O antygenów z *K. pneumoniae*. Ta szybka analiza pozwoliła na bardzo ważną konkluzję, iż 10 badanych OPS-ów (rozszerzonych później o jeden dodatkowy), tworzy cztery różniące się od siebie strukturalnie grupy, spośród których tylko

jedna (BIDMC 7B i ABC152) reprezentowała znany antygen użyty do porównania. Bioinformatyczna analiza klastrów genów (*O loci*) specyfikujących indywidualne O serotypy z użyciem narzędzia Kaptive wykazała niejednoznaczne serotypowanie dla trzech, spośród czterech grup strukturalnych. By rozwikłać zagadkowe wyniki uzyskane w tej części pracy, Doktorantka podjęła się szczegółowych badań strukturalnych wszystkich grup zidentyfikowanych we wstępnych pomiarach. Dokładna analiza NMR fragmentu OPS pierwszej grupy strukturalnej (BIDMC 7B i ABC152) wykazała, że jest to serotyp O2v1 a nie jak na to wskazywał program Kaptive O2v2. Dokładna analiza porównawcza klastra genów *rfb* wykazała, że insert ISR1 powoduje kompletne zaburzenie genu Gm1B glikozylotransferazy, co skutkuje biosyntezą O antygeny O2v1 zamiast O2v2. Wykazano również w analizie *in silico*, że ~2.4 % izolatów O2v2 demonstruje istotne różnice w długości regionu *rfb*. Analiza drugiej grupy strukturalnej (ABC122, BC738, BC13-986) została rozszerzona o jeszcze jeden izolat kliniczny OL101, który wykazywał duże podobieństwo wskazane przez program Kaptive do badanych izolatów. Dokładna analiza strukturalna reprezentanta grupy, ABC122, przeprowadzona na bazie jego OPS i produktach hydrolizy a także dalszych modyfikacjach celem przeprowadzenia analizy kompozycji cukrów oraz pozycji ich podstawienia, wykazała, że jest to zupełnie nowy O serotyp, który został nazywany przez autorów O13 zgodnie z kolejnością numeracji serotypów. Ponadto bioinformatyczna analiza częstości występowania owego serotypu wskazała na wartość 6,55% spośród 71377 genomów dostępnych publicznie w bazach danych. Analiza trzeciej grupy strukturalnej (Kp164, Kp165 i Kp166) nie była tak dogłębna jak poprzedniej, gdyż analiza przesunięć chemicznych OPS wykazała ten sam system spinowy jak opublikowany wcześniej antygen O4. Ponadto widmo ¹H HR-MAS NMR całego LPS-u Kp164 ukazało obecność końca α -Kdop (reszty K), co jest typowe dla serotypu O4. To samego typowanie przyniosła również wstępna analiza bioinformatyczna *O loci* wykonana przy użyciu narzędzia Kaptive. Autorka wykazała dalej, że przypisanie izolatów tej grupy jako nietypowych wynikało z błędnego doboru próbki referencyjnej, którą był szczep PCM15 jako O4:K15 pochodzący z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Przeprowadzana analiza typowania mikroorganizmów na tymże szczepie z użyciem MALDI-TOF Biotyper

wykazała bez żadnej wątpliwości, że jest to inna bakteria, *Enterobacter cloacae*. Jak dobrze rozumiem, oznacza to, że PCM15 został zdeponowany w kolekcji mikroorganizmów pod błędną nazwą? Odnośnie czwartej grupy strukturalnej (Kp174 i Kp177), to wykazano, że w obu przypadkach brak jest OPS po hydrolizie LPS, co zostało potwierdzone odpowiednimi widmami NMR. Oznacza to, że oba przypadki to tzw. „szorskie” LPS, co wyjaśnia przyczyny niepowodzenia serotypowania z użyciem narzędzi bioinformatycznych.

Dyskusja wyników w postaci 11-stronnicowego rozdziału jest przygotowana bardzo starannie i co ważne, nie jest powieleniem wyników ale ich autentyczną dyskusją bazującą na literaturze jak i doświadczeniu własnym oraz zespołu, w którym pracowała Doktorantka. Bardzo przydatna jest tu Tabela 15, która podsumowuje wyniki uzyskane w pracy dzieląc O serotypy względem wstępnych strukturalnych danych NMR i przede wszystkim ukazująca wyniki serotypowania na podstawie programu Kaptive oraz przeprowadzonej analizy NMR lub analizy NMR rozszerzonej o analizę reszt cukrowych i ich podstawień. Do tabeli dołączone jest podsumowanie najważniejszych wyników, co zdecydowanie pomaga czytelnikowi dobrze zorientować się zarówno w treści rozdziału jak i interpretacji uzyskanych danych. Najmniej zrozumiała jest dla mnie część poświęcona częstości występowania nowych O serotypów a szczególnie ich modyfikacji bazująca na bazie dostępnych genomów *K. pneumoniae*. W związku z tym proszę Doktorantkę o zrozumiałe przedstawienie analizy owych danych jak i jej dyskusję podczas obrony. Pomijając tę niejasność, dyskusja napisana jest bardzo zgrabnie i co ważne w analityczny sposób. To samo podejście zastosowała Autorka w ostatnim rozdziale „Konkluzje”. Schematyczny opis (dosłownie) ułatwia czytelnikowi raz jeszcze przejście przez najważniejsze osiągnięcia zrealizowanej pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa prezentuje bardzo dobrze i z tego co się orientuje wykonany w odpowiednim czasie, projekt pracy doktorskiej, który został zwieńczony dwiema publikacjami eksperymentalnymi w *International Journal of Molecular Sciences* i prestiżowego *Carbohydrate Polymers*. Do listy tej powinna zostać dodana trzecia praca - praca przeglądowa, której Doktorantka jest również pierwszą Autorką. Praca napisana jest

poprawnym językiem, a w jej treści znalazłem jedynie drobne błędy językowe. Z błędów wynikających z zastosowania języka angielskiego należy wymienić użycie przecinków, nie kropek w wartościach numerycznych. Praca opatrzona jest jasnymi i dobrze przygotowanymi ilustracjami, jednakże rozdzielczość lub wielkość niektórych z nich jak Rysunku 5, 15 a zwłaszcza 6 jest niewystraszająca. Doktorantka nie uchroniła się także przed niektórymi błędami logicznymi upraszczając LPS i OPS do jednego poziomu strukturalnego (rozdział 6.6, 7.1). Nie mam zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy. Jednakże do wymienionych wyżej pytań wynikających z ciekawości chciałbym dodać następujące:

- Eksperyment HR-MAS NMR znajduje zastosowanie w badaniu zarówno amfifilowych cząsteczek jak i ciał stałych, półstałych, półpłynnych itp. W metodzie tej próbkę umieszcza się pod „magicznym” kątem (stąd „high resolution magic angle spinning” NMR) $54,7^\circ$ względem pola magnetycznego co skutkuje uśrednieniem i wyzerowaniem anizotropii przesunięć chemicznych oraz sprzężeń dipolowych. To w konsekwencji prowadzi do zwiększenia stosunku sygnału do szumu typowych dla układów niejednorodnych. Czy w Pani badaniach użycie tego eksperymentu było konieczne skoro próbki były jednorodne (zwłaszcza OPS-ów) i czy poprawiał on czułość pomiaru w stosunku do konwencjonalnych pomiarów NMR?

- Czy może Pani wyjaśnić w jaki sposób bakterie Gramm-ujemne gubią OPS-y w LPS-ach stając się typami „szorstkimi”? – czwarty typ strukturalny w Pani pracy.

- Czy może Pani przybliżyć niespecjalistom, łącznie ze mną, jaka jest natura i pochodzenie insertów pojawiających się w genach *rfb* przyczyniających się do problemów z szybkim serotypowaniem szczepów *K. pneumoniae*?

- Pisze Pani o problemach z narzędziem Kaptive w identyfikacji serotypów. Jaki jest zatem udział poprawnie typowanych serotypów?

Reasumując, mimo pewnych niedociągnięć, o których wspomniałem powyżej, stwierdzam, że przyszło mi recenzować bardzo ciekawą pracę, której wyniki są wysoce wartościowe pod względem technicznym i naukowym. Praca pani mgr Darii Artyszuk to przykład bardzo

dobrze zrealizowanego projektu badawczego o charakterze interdyscyplinarnym. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Darii Artyszuk w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zwarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z tym, że wszystkie zaprezentowane w rozprawie wyniki zostały już opublikowane a Doktorantka jest ich pierwszą autorką a także ze względu na fakt, że jedna z powstałych prac została opublikowana w renomowanym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

