



WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA  
Uniwersytet Łódzki

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	22-06-2020
L. dz.	632

Łódź, 15.06.2020 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

### Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Karoliny Ucieklak**

pt. „Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* jako uniwersalne składniki szczepionek”

Rozprawa doktorska mgr K. Ucieklak została wykonana w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, pod kierunkiem Promotora dr hab. Tomasza Niedzieli, prof. PAN. Celem badań doktorantki była analiza struktur antygenów powierzchniowych bakterii z rodzaju *Bordetella* i ustalenie wspólnych fragmentów, które mogłyby być wykorzystane w opracowaniu nowej, uniwersalnej szczepionki przeciwrztuścowej, chroniącej nie tylko przed zakażeniem *Bordetella pertussis*, ale też innymi bakteriami z rodzaju *Bordetella*.

Od lat krztusiec zaliczany jest do chorób wieku dziecięcego, ale stosowanie szczepionek spowodowało przesunięcie wieku zachorowania. Obserwuje się przypadki zachorowania dzieci w wieku poniżej 6 tygodni, które nie były poddane pełnemu cyklowi szczepień i dzieci powyżej 10 lat życia oraz dorosłych, u których ochrona wygasła. Krztusiec z typowymi objawami wywołuje *B. pertussis*, ale jak wykazano, inne gatunki bakterii z rodzaju

*Bordetella* wywołują parakrzusiec, o objawach bardzo podobnych. Do tych bakterii zaliczamy *Bordetella parapertussis* i *Bordetella holmesii*. Obserwowany wzrost zachorowań na krztusiec wynika m.in. z zastąpienia szczepionki pełnokomórkowej, bezkomórkową. Okres ochronny wywołany podaniem tej ostatniej jest krótszy. Ponadto w szczepionce bezkomórkowej występuje znacznie mniej antygenów bakteryjnych, co skutkuje dryfem antygenowym i pojawieniem się szczepów o zmienionych białkowych czynnikach wirulencji, przed którymi takie szczepionki nie mogą chronić. Doktorantka nie zajęła się antygenami białkowymi bakterii z rodzaju *Bordetella*, tylko cukrowymi, kontynuując badania naukowe prowadzone już wcześniej przez Promotora, wykorzystując doświadczenia zespołu immunochemii bakterii IITD PAN we Wrocławiu, zdobyte w trakcie wieloletnich badań antygenów cukrowych różnych patogenów. Mgr K. Ucieklak przygotowała rozprawę, której wyniki mają wysoką wartość poznawczą i praktyczną. Jej badania wpisują się w ważny nurt badań immunochemicznych, których celem jest identyfikacja bakteryjnych antygenów wspólnych, zdolnych do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał o charakterze ochronnym, reagujących nie tylko w układach homologicznych, ale też krzyżowo. Takie przeciwciała mogą chronić przed zakażaniem różnymi bakteriami, ale o podobnych właściwościach chorobotwórczych.

Rozprawa mgr K. Ucieklak ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W obszernym Wstępie Autorka na początku przedstawiła historię krztuśca i przebieg tej choroby. Dalej znajdujemy charakterystykę rodzaju *Bordetella*, w tym omówienie gatunków i znaczenia epidemicznego bakterii tego rodzaju, innych niż *B. pertussis*. Duży fragment Wstępu poświęciła omówieniu diagnostyki mikrobiologicznej i molekularnej kłustra *Bordetella bronchiseptica*. We Wstępie zamieszczono szeroki opis antygenów bakterii tego kłustra, ze szczególnym uwzględnieniem powierzchniowych antygenów cukrowych i cukrowo-lipidowych. Bakterie te wytwarzają zewnątrzkomórkowe

polisacharydy otoczkowe, LPS lub lipooligosacharyd (LOS). Ten ostatni z wymienionych zawiera lipid A oraz oligosacharyd rdzeniowy z maksymalnie 12 resztami cukrowymi. Taki LOS jest typowy dla *B. pertussis*. Zbliżoną budowę oligosacharydu rdzenia ustalono dla *B. bronchiseptica*, podczas gdy oligosacharyd *B. parapertussis* nie zawiera dystalnego trisacharydu, terminalnej reszty N-acetylo-galaktozaminy i terminalnej reszty LD-heptozy. Te dwa gatunki bakterii wytwarzają też polisacharydy O-swoiste o charakterze homopolimerów, przyłączonych do rdzenia w LPS. Doktorantka scharakteryzowała także we Wstępie egzopolisacharydy wytwarzane przez *Bordetella* spp. Obszerny fragment tej części rozprawy poświęciła szczepionkom przeciwkrtuścowym, pełnokomórkowym i bezkomórkowym, ich stosowaniu, efektywności i problemom, jakie pojawiły się w trakcie ich wykorzystywania. Przedstawiała też możliwości wykorzystania neoglikokoniugatów jako szczepionek, w tym doświadczenia w tym zakresie Laboratorium, w którym wykonała pracę doktorską. Wstęp kończą opisy technik chemicznych w badaniach strukturalnych antygenów cukrowych i glikokoniugatów.

Informacje zaprezentowane we Wstępie oraz ich ocena świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań doświadczalnych. Wykazała się dobrą znajomością literatury, przedstawiając charakterystykę bakterii – obiekt badań, epidemiologię zakażeń *Bordetella* oraz stosowanie szczepionek przeciwkrtuścowych i w tym kontekście możliwości zastosowania antygenów cukrowych w takich szczepionkach.

Cel pracy składa się z dwóch fragmentów. W pierwszym Doktorantka uzasadnia potrzebę badań nad antygenami cukrowymi *Bordetella*, w tym nie analizowanych dotychczas gatunków. Wskazuje na zmienność antygenów białkowych i stabilność powierzchniowych antygenów zawierających cukry. Podkreśla też małą wiedzę o antygenach typu otoczkowego, wytwarzanych przez *Bordetella*. W drugim fragmencie Celu pracy precyzuje zakres swoich

badan. Obejmuje on identyfikację wspólnych fragmentów strukturalnych powierzchniowych antygenów cukrowych, które mogłyby być wykorzystane do opracowania nowej szczepionki anty-krztuścowej o charakterze protekcyjnym, w odniesieniu nie tylko do *B. pertussis*, ale też *B. parapertussis* i *B. holmesii*.

W kolejnym rozdziale dysertacji doktorskiej mgr K. Ucieklak przedstawia materiał i metody badań. Materiał do badań stanowiły szczepy *B. pertussis* 186 i 606, *B. parapertussis* PCM 529, *B. bronchiseptica* PCM 530, *B. holmesii* DSM 13416 oraz *B. hinzii* DSM 11333 i *B. petrii* DSM 12804. Te ostatnie dwa gatunki włączono do pracy, aby sprawdzić, czy bakterie nie zaliczone do klastra *B. bronchiseptica* wytwarzają egzopolisacharydy. Przedstawiono podłoża i warunki hodowli tych bakterii w kontekście zadań badawczych, w tym potrzeby izolacji LPS, LOS i egzopolisacharydów. Opisano wnikliwie wykorzystane w pracy metody preparatywne, tak dotyczące ww. antygenów lipidowo-cukrowych jak i cukrowych oraz toksoidu tężca, a także otrzymania neoglikokoniugatów. W kolejnym rozdziale metodycznym przedstawiono wykorzystane surowice i preparaty antygenów oraz techniki immunochemiczne potrzebne do realizacji celu pracy. Wykorzystano m.in. neoglikokoniugaty i surowice uzyskane wcześniej przy realizacji grantu *Szczepionki przeciwbakteryjne nowej generacji. Otrzymywanie, charakterystyka immunochemiczna, właściwości ochronne* finansowanego z EFRR POIG. Była to bogata kolekcja preparatów i surowic. Opis technik badań immunochemicznych (SDS-PAGE oraz Western-blotting i Dot-blotting), jak również metody analiz chemicznych w tym m.in. warunki hydroliz polisacharydów i analizę metylacyjną przedstawiono wyczerpująco, podobnie jak szerokie spektrum analiz instrumentalnych (HPLC, GC-MS, różne techniki spektrometrii masowej). Ta część rozprawy doktorskiej mgr K. Ucieklak wskazuje na dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki do podjęcia badań doświadczalnych. Zastosowano wiele technik badawczych, adekwatnie dobranych do zadań postawionych w realizowanej rozprawie doktorskiej, od podstawowych, typowych mikrobiologicznych i

immunochemicznych, po bardzo nowoczesne metody z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas (MS) i spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Ich poznanie i umiejętność praktycznego wykorzystania, wymagało od Doktorantki zaangażowania i pracowitości, czym się wykazała.

Wyniki badań zostały starannie opracowane i przedstawione przejrzyście w oddzielnym rozdziale dysertacji, a zaprezentowana ich dokumentacja, w formie rycin, zdjęć i tabel, nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka zrealizowała podstawowe cele pracy. Potwierdziła obecność w badanych preparatach LOS z *B. pertussis* 186 u 606, jak i *B. parapertussis* 529, a także *B. bronchiseptica* 530 i 1943 rdzenia o minimalnej wspólnej strukturze obejmującej heksasacharyd zbudowany z Kdo, dwóch reszt heptoz, glukozaminy, kwasu glukuronowego i glukozy. Bardziej złożony rdzeń stanowiący nonasacharyd wytwarzają bakterie *B. pertussis* 606, w którym do glukozy ww. heksasacharydu podstawiony jest w pozycji 4 disacharyd zawierający heptozę i glukozę, a w pozycji 6 kwas galaktozaminouronowy. Mgr K. Ucieklak wykazała, iż najbardziej rozbudowany oligosacharyd rdzeniowy syntetyzują bakterie *B. pertussis* 186 - jest to dodekasacharyd, w którym oprócz ww. składników rdzenia obecny jest też dystalny trisacharyd złożony z N-acetylo-glukozaminy, kwasu diacedamido-2,3-dideoksymannouronowego i 2-acetamido-4-N-metylo-2,4,6-deoksygalaktozy przyłączony do glukozaminy w pozycji 6. W kolejnym etapie pracy Doktorantka stwierdziła, iż dwa szczepy *B. bronchiseptica* 530 i 1943 wytwarzają LPS typu szorstkiego. Ich LPS składa się z heksasacharydu podstawionego w pozycjach 6 i 4 odpowiednio kwasem galaktozaminouronowym oraz niekompletnie disacharydem zbudowanym z heptozy i glukozaminy. Inaczej zbudowany jest LPS *B. parapertusis* 529. Jest on heterogeny pod względem struktury. Bakterie wytwarzają jego różne formy, gdzie podstawowa strukturę heksasacharydu jest podstawia różnymi cukrami charakterystycznymi dla pozostałych *Bordetella*. W niewielkim stopniu wykrywa się u tych bakterii też oligosacharyd rdzeniowy z pełną strukturą obejmującą 12 składników. Badania wcześniej nie

analizowanego rdzenia LOS *B. holmesii* ATCC 51541 wykazały, iż jest identyczny jak rdzeń *B. pertussis* 606 to znaczy jest nonasacharydem. LPS badanego szczepu *B. holmesii* ma gładki charakter i zawiera antygen O składający się z powtarzających się podjednostek cukrowych o strukturze pentasacharydu obejmującego po jednej reszcie ramnozy, glukozy i galaktozy i dwóch cząsteczek N-acetylo-glukozaminy.

Wyniki przeprowadzonych przez mgr K. Ucieklak analiz LOS i LPS *Bordetella*, a zwłaszcza wykazanie, iż wszystkie badane gatunki wytwarzają wspólny heksasacharydowy konserwatywny fragment są ważne, gdyż wskazują na możliwe jego zastosowanie w tworzeniu glikokoniugatowej szczepionki, która powinna stymulować makroorganizm do wytwarzania przeciwciał protekcyjnych o szerokim spektrum działania wobec bakterii tego rodzaju. Obecność wspólnych epitopów cukrowych w badanych LOS *Bordetella* potwierdzono w reakcjach z surowicami anty-glikoniugatowymi zawierającymi przeciwciała przeciwko zdefiniowanemu fragmentom *B. pertussis* 186 oraz surowicom przeciwko pełnym komórkom bakterii.

W kolejnym etapie pracy doktorskiej wyizolowano z podłoża pohodowlanego egzopolisacharydy *Bordetella*. Analiza strukturalna wykazała, iż mają one naturę glukanów, gdzie reszty glukozy są połączone wiązaniami  $\alpha 1,4$  lub  $\alpha 1,6$ . Opisano też nowy typ egzopolisacharydu, o którym wcześniej nie było doniesień. Najpierw przeanalizowano jego budowę u *B. holmesii*, aby później potwierdzić jego wytwarzanie u pozostałych badanych *Bordetella*. Zaproponowano dla tego produktu nazwę „*Bordetella* oligosaccharide” (BOS) i ustalono jego strukturę. Jest to heksasacharyd z dwiema resztami N-acetylo-glukozaaminy, dwiema resztami kwasu N-acetylo-galaktozaminouronowego i jednej reszty kwasu N-acetylo-glukozaminouronowego ułożonymi liniowo i reszty glukozy obecnej w bocznym odgałęzieniu. Badania chemiczne BOS wskazują na możliwe jego zakotwiczenie w błonie zewnętrznej bakterii poprzez niezidentyfikowany lipid.

Pragnę podkreślić, iż mgr K. Ucieklak otrzymała ważne rezultaty znacząco rozszerzające wiedzę o antygenach cukrowych *Bordetella*. Wskazała na możliwość ich wykorzystania w przygotowaniu nowej glikokoniugatowej szczepionki o szerokim spektrum ochronnym wobec bakterii rodzaju *Bordetella*.

W dyskusji szczegółowo analizuje uzyskane dane w kontekście wyników innych badawczy. Jeszcze raz, poza Wstępem, podnosi kwestie efektywności szczepień z zastosowaniem różnych szczepionek przeciwkrztuścowych i znaczenie chorobotwórcze innych niż *B. pertussis* bakterii, w wywoływaniu choroby o identycznych objawach do krztuśca, ale o łagodniejszym przebiegu. Ten fragment pracy wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i jej umiejętności analizy nie tylko swoich wyników badań, ale i danych z literatury. Zestawienie literatury w liczbie 167 pozycji obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie. Praca zawiera bogatą dokumentację 89 rycin i 19 tabel oraz jedną zbiorczą tabelę w Materiałach dodatkowych.

Nie mam uwag do zastosowanych metod i technik badawczych. Doktorantka, jak wspomniałem wyżej, wykorzystwała najnowsze metody i techniki, właściwe do zrealizowania postawionych zadań badawczych. Nie mam też zastrzeżeń do uzyskanych wyników.

Uwagi i pytania:

- 1) Uważam, iż Rozdział 9 rozprawy to więcej niż wnioski. Ten bardzo dobrze opracowany rozdział moim zdaniem stanowi podsumowanie pracy,
- 2) Nie mogę zgodzić się z sformułowaniem, iż „antygenem cukrowym będącym integralnym składnikiem osłony bakterii Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd” (str. 31). LPS zawiera nie tylko cukry,
- 3) Czy nie powinno się pisać po polsku polisacharydy otoczkowe zamiast kapsularne (str. 31), mikrootoczka zamiast mikrokapsuła (str. 38),
- 4) We Wstępie Doktorantka charakteryzuje główne techniki badawcze stosowane w analizach chemicznych glikokoniugatów. Brak choćby

krótkiego podrozdziału o technikach immunochemicznych, z których też korzystała w części praktycznej pracy,

- 5) Czy są kontynuowane badania BOS, szczególnie potencjalnej kotwicy lipidowej tego składnika bakterii ?
- 6) Potknięcia stylistyczne zaznaczyłem w otrzymanym egzemplarzu rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Karoliny Ucieklak pt. „Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* jako uniwersalne składniki szczepionek” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Noiński