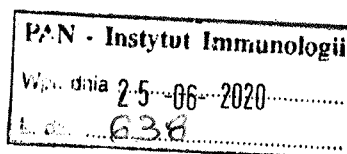


dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS
Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej



Lublin, 24.06.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Ucieklak pt.:
„Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella*
jako uniwersalne składniki szczepionek”

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Ucieklak została wykonana pod kierunkiem dr hab. Tomasza Niedzieli, w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Rozprawa została przygotowana zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, oraz rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana w laboratorium i zespole posiadającym wieloletnie doświadczenie w badaniach nad opracowaniem szczepionek na bazie glikokonjugatów. Owocem tych prac jest szereg publikacji, których współautorem jest Promotor rozprawy dr hab. Tomasz Niedziela. Dotyczą one m. in. neoglikokoniugatów opartych o oligosacharydy wyizolowane ze szczepu *Bordetella pertusis* 186, o potencjalnym zastosowaniu jako składniki szczepionki przeciwkrztuścowej. Podobną tematyką zajmowała się Doktorantka, która w toku swych badań, prowadzonych przy zastosowaniu nowoczesnych metod i technik analitycznych, otrzymała również bardzo interesujące i wartościowe wyniki.

Doktorantka nie umieściła w rozprawie spisu swojego dorobku naukowego, w związku z tym skorzystałam z ogólnodostępnej bazy Web of Science. Z informacji tam zawartych wynika, że Pani



mgr Karolina Ucieklak jest współautorką dwóch prac, które ukazały się w *Molecular Immunology* i *International Journal of Molecular Sciences* (oba czasopisma z listy JCR). Jest to dorobek wystarczający do spełnienia wymogów zapisanych w/w ustawie, a dotyczących przebiegu przewodu doktorskiego. Prace te nie zawierają wyników badań opisanych w rozprawie.

Ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim i ma układ typowy dla eksperymentalnych prac dyplomowych. Praca liczy 192 strony i zawiera 89 rycin oraz 20 tabel (w tym jedna umieszczona na końcu pracy jako „Materiały dodatkowe”). Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim i poprawnie językowo.

Tytuł pracy brzmiący: „Wspólne elementy w strukturze antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* jako uniwersalne składniki szczepionek” został sformułowany poprawnie i w pełni oddaje treść pracy.

Pracę rozpoczyna obszerny, prawie trzystronicowy wykaz skrótów, zawierający tłumaczenie stosowanych w pracy skrótów w języku polskim, wraz z ich oryginalnym rozwinięciem w języku angielskim. W dalszej kolejności pojawia się, jak dla mnie zbyt obszerne, czterostronicowe „Streszczenie pracy” oraz równie obszerne streszczenie w języku angielskim.

Wstęp pracy liczy 33 strony, zawiera 6 podrozdziałów głównych i liczne podrozdziały drugiego i trzeciego-rzędu (niestety nie wszystkie zostały uwzględnione w spisie treści) i wprowadza czytelnika w tematykę pracy doktorskiej. W tej części pracy Doktorantka przedstawiła informacje dotyczące przedmiotu badań. I tak, w podrozdziale 1) Doktorantka przedstawia aspekt historyczny badań nad krztuścem; w podrozdziale 2) przedstawiono charakterystykę czynnika etiologicznego krztuśca (*Bordetella*) wraz z przeglądem epidemiologicznym i diagnostyką zakażeń; podrozdział 3) to opis dotąd poznanych antygenów powierzchniowych *Bordetella*; podrozdział 4) zawiera opis stosowanych i będących w fazie testów szczepionek przeciwkrztuścowych; zaś podrozdział 5) to opis sukcesów Zespołu w dziedzinie projektowania neoglikokonjugatów i produkcji szczepionek glikokonjugatowych przeciwko *B. pertusis*. Odrębną część stanowi podrozdział 6), w którym Doktorantka zawarła opis głównych technik stosowanych w analizie antygenów cukrowych i glikokonjugatów: spektrometrię mas oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego. Techniki te zostały opisane w sposób jasny i przystępny, daje się zauważyć, że Doktorantka jest doskonale z nimi obeznana.

Cel pracy został jasno i precyzyjnie sformułowany. Jest nim „...zidentyfikowanie w powierzchniowych strukturach antygenów cukrowych bakterii z rodzaju *Bordetella* wspólnych elementów, których wyizolowane formy mogłyby zostać wykorzystane przy zaprojektowaniu nowej

uniwersalnej szczepionki przeciwkrztuścowej”. Takie sformułowanie celu wskazuje na szeroki zakres badań, jakich podjęła się Doktorantka. Obejmują one usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej cukrowych antygenów powierzchniowych z różnych szczepów, zarówno tych, które wywołują krztusiec, jak i parakrztusiec oraz inne choroby układu oddechowego a także poszukiwanie, izolację i charakterystykę nowych antygenów cukrowych u przedstawicieli *Bordetella*.

Rozdział „Materiały i metody” liczący 14 stron zawiera bardzo szczegółowe informacje na temat stosowanych przez Doktorantkę metod i technik badawczych, począwszy od typowo mikrobiologicznych, poprzez tzw. metody „mokrej chemii” (metody preparatywne), immunochemiczne, analizy chemiczne, oraz metody instrumentalne. Wielość i różnorodność stosowanych przez Doktorantkę metod i technik badawczych świadczy o jej wszechstronności i bardzo dobrym warsztacie naukowym.

Rozdział „Wyniki” liczy 86 stron i jest najbardziej obszerny (stanowi niemal 50 % objętości rozprawy). Jest napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały. W większości bardzo starannie przygotowane, wielokolorowe ryciny ułatwiają czytelnikowi analizę przedstawionych w rozprawie wyników badań. Imponująca jest ilość rozwiązanych i dokładnie opisanych widm NMR preparatów oligosacharydowych. Widać, że Doktorantka biegle opanowała interpretację wyników analiz spektroskopowych. Doktorantka szczegółowo opisuje sposób doboru warunków hodowli szczepów należących do rodzaju *Bordetella* na podłożu standardowo używanym do hodowli szczepów szczepionkowych pałeczki krztuśca. Otrzymane masy bakteryjne posłużyły Jej do izolacji lipoi oligosacharydów, natomiast płyn pohodowlany do otrzymania egzopolisacharydów i oligosacharydu nazwanego później BOS. Preparaty LPS i LOS zostały poddane analizie serologicznej, przy wykorzystaniu poliwalentnych surowic króliczych skierowanych przeciwko zdefiniowanym antygenom cukrowym lub ich glikokoniugatam. Doktorantka wykazała się biegłością w stosowaniu technik immunoenzymatycznych. Preparaty LPS/LOS zostały poddane hydrolizie, a oddzielone heteropolisacharydy i oligosacharydy rozdzielano metodą frakcjonowania metodą sączenia molekularnego. Wybrane frakcje poddano analizom porównawczym przy zastosowaniu techniki spektroskopii NMR. Poszukiwano wspólnych dla badanych szczepów fragmentów cukrowych. Nowością w pracy jest przedstawienie struktury lipopolisacharydu *B. holmesii* ATCC 51541 szczepu stosunkowo niedawno opisanego. Doktorantka bazowała na analizach spektrometrycznych (MALDI-TOF) oraz spektroskopii NMR, co pozwoliło Jej na ustalenie struktury oligosacharydu rdzenia LPS tej bakterii oraz powtarzającej się podjednostki łańcucha O-swoistego. Kolejna część pracy Doktorantki dotyczyła analizy strukturalnej egzopolisacharydów produkowanych przez wybranych przedstawicieli rodzaju *Bordetella*,

począwszy od *B. holmesii*, poprzez bakterie należące do klastra *B. bronchiseptica*. Wyizolowano dwa homopolimery glukanowe oraz sześciocukrowy oligosacharyd, który okazał się wspólny dla wszystkich badanych szczepów i został przez Doktorantkę nazwany BOS (*Bordetella oligosaccharide*). Został on również przebadany technikami serologicznymi, przy użyciu dostępnych w kolekcji Laboratorium surowic poliklonalnych. Na koniec Doktorantka wykonała testową próbę otrzymania neoglikokoniugatu na bazie BOS i toksoidu tężcowego i uzyskała obiecujące wyniki.

Rozdział „Dyskusja” liczący 12 stron jest bardzo dobrze napisany. Doktorantka w dojrzały sposób interpretuje uzyskane wyniki, porównuje je z danymi literaturowymi, wskazuje na pewne podobieństwa z pracami innych autorów, ale też w zręczny sposób potrafi zinterpretować widoczne różnice w uzyskanych wynikach. Doktorantka przedstawia plany dalszych badań, co wskazuje, że jej praca doktorska jest tylko rozpoczęciem tematu i należy się spodziewać, że końcowym efektem prac będzie nowa szczepionka przeciwkrztuścowa.

Pracę kończy rozdział „Wnioski” liczący 4 strony, na których Doktorantka podsumowuje swoje najważniejsze osiągnięcia.

Wykaz literatury (powinno być raczej: „Piśmiennictwo”) liczy 167 pozycji, umieszczonych w porządku alfabetycznym. W większości są to publikacje, które ukazały się po roku 2000.

Na końcu pracy Doktorantka zamieściła rozdział 12. zatytułowany: „Materiały dodatkowe”, który zawiera zbiorczą tabelę z wartościami przesunięć chemicznych dla poszczególnych układów spinowych w preparatach oligosacharydowych LPS analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*. Tabela ta może być bardzo wartościowym materiałem źródłowym i porównawczym dla innych badaczy.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe

Moim zdaniem najważniejsze osiągnięcia naukowe zaprezentowane w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej to:

1. Przeprowadzenie kompleksowych badań porównawczych oligosacharydu rdzeniowego bakterii z rodzaju *Bordetella*, biorąc pod uwagę zarówno szczepy już opisane przez innych autorów, jak i nowe, nigdy nie analizowane pod tym kątem. Badania strukturalne zostały uzupełnione o analizy serologiczne z przeciwciałami poliklonalnymi. Pozwoliło to na zidentyfikowanie najmniejszego wspólnego elementu strukturalnego, jakim jest heksasacharyd.
2. Wyizolowanie i ustalenie struktury oraz masy cząsteczkowej nowego, dotąd nieopisanego polimeru cukrowego, wykrytego w płynie pochodzącym początkowo jedynie u *B. holmesii*, a później u wszystkich analizowanych bakterii z rodzaju *Bordetella*, również u gatunków

nienależących do klasycznych *Bordetellae*. Badania wykonane wskazują na jego kapsularny charakter, co ucina dyskusje prowadzone w literaturze na temat obecności lub braku polisacharydu kapsularnego w grupie *Bordetellae*. Doktorantka dla tego polimeru zaproponowała nazwę BOS (*Bordetella oligosaccharide*) i charakteryzuje go jako rozgałęziony heksasacharyd zawierający w swej strukturze rzadko występujące reszty α -2-acetamido-2-deoksy-galakturonoamidu. Podjęta została próba syntezy glikokoniugatu BOS z toksoidem tężcowym. Doktorantka planuje dalsze badania tego glikokoniugatu z użyciem zwierząt oraz analizę reaktywności surowic i przeciwciał anti-BOS-TTd.

3. Opisanie i ustalenie struktury antygeny O-swoistego *B. holmesii* ATCC 51541, wraz z określeniem wielkości powtarzającej się podjednostki.
4. Wykrycie w płynie pochodzącym z klastra *B. bronchiseptica* dwóch rodzajów glukanów o strukturach: $[\rightarrow 4-\alpha-D-Glcp-(1\rightarrow)]$ oraz $[\rightarrow 6-\alpha-D-Glcp-(1\rightarrow)]$.

Podsumowując, Doktorantka zidentyfikowała wspólne elementy, które mogą zostać potencjalnymi szczepionkowymi antygenami przeciwkrtuscowymi. Wg. Doktorantki, zarówno heksasacharydowy OS jak i BOS to potencjalne składniki szczepionki glikokoniugatowej, która byłaby w stanie generować powstanie przeciwciał, zapewniających długotrwałą ochronę przed zakażeniem przedstawicielami grupy *Bordetellae*. Szczepionka oparta o BOS potencjalnie może chronić przed transmisją i zakażeniami bakteriami wywołującymi krtusiec oraz przed chorobami układu oddechowego wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Bordetella*.

Komentarze i pytania

Proszę, aby Doktorantka ustosunkowała się do następujących kwestii:

1. Czy szczepionka oparta na opisanych przez nią glikokoniugatach ma szansę okazać równie skuteczna, jak szczepionka przeciwkrtuszcowa pełnokomórkowa i czy będzie od niej bardziej bezpieczna?
2. Pytanie, które nie jest ściśle związane z tematyką rozprawy, ale nasuwa się w świetle doniesień medialnych. A mianowicie: czy Doktorantka jest w stanie zabrać głos w dyskusji na temat sensowności stosowania szczepień. Jakie argumenty wg Doktorantki można wysunąć przeciwko pojawiającym się w ostatnich latach ruchom antyszczepionkowym, m. in. kwestionującym konieczność powszechnych szczepień przeciwko wirusowym i bakteryjnym chorobom zakaźnym.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre uwagi do strony edytorskiej pracy:

1. W rozdziale Wstęp, podrozdział 4.3. Doktorantka opisuje toksynę krztuścową. W moim odczuciu przydałby się tutaj rysunek – schemat obrazujący toksynę.
2. Ryc. 2. „Budowa osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych” – powinno być raczej: „Budowa osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych”.
3. Rozdział: Materiały i metody, str. 54. Doktorantka przelicza jednostki MFU na liczbę komórek bakteryjnych, podając, że jest to $100 \times 10^6 - 1500 \times 10^6$ komórek w 1 ml. Prawidłowy zapis powinien wyglądać następująco: $1 \times 10^8 - 1,5 \times 10^9$ komórek/ml.
4. Rozdział: Materiały i metody, str. 55, wiersz 1-2 od góry: Jak rozumieć zapis: „Hodowla płynna była zakładana poprzez zawieszenie bakterii na płytce z odpowiednim podłożem i przeniesieniu ich do pożywki płynnej.” Czy bakterie były po prostu splukiwane z płytki, czy też do inokulacji stosowano hodowle założone z pojedynczej kolonii – co jest podejściem stosowanym powszechnie w praktycznej mikrobiologii?
5. Doktorantka stosuje zamiennie termin: „toksoid tężca” i „toksoid tężcowy”- oba pojawiają się na tej samej stronie w pracy (np. str. 59). Wydaje się, że jedynie ta druga forma jest prawidłowa.
6. Rozdział: Wyniki, str. 72, podrozdział 7.2.2. Doktorantka przywołuje Ryc. 15, choć powinna najpierw zacytować Ryc. 14. Proszę odnieść się do kolejności rycin.
7. Rozdział: Wyniki, str. 84, Tabela 9. Doktorantka podaje uśrednione wartości przesunięć chemicznych składników OS analizowanych szczepów *Bordetellae* w tym samym otoczeniu. Podawanie wartości uśrednionych, bez odchyłeń standardowych jest myląca i utrudnia analizę wyników zawartych w kolejnej Tabeli (nr 10.), gdzie Doktorantka podaje wartości przesunięć chemicznych dla połączeń między resztami cukrowymi w eksperymentach NOESY i HMBC dla konkretnego preparatu (OS *B. pertusis* 606).
Z kolei w Tabeli 16, str. 122-123 Doktorantka podaje wartości odchyłeń standardowych, jednak nie stosuje przy tych wartościach znaku \pm i nawiasu, co też budzi pewną konsternację. Ponadto, Tabela 16-ta jest źle zedytowana: jej tytuł i nagłówek znajduje się na stronie 122, zaś cała reszta już na stronie 123.
8. Rozdział: Wyniki, str. 101, pośrodku strony: Reszta **D** – podano stałą sprzężenia $J_{C1,H1} \sim 162$ Hz jako świadcząca o α -konfiguracji reszty D-Glc, natomiast poniżej, opisując resztę **E** wartość $J_{C1,H1} \sim 164$ Hz jest podana jako charakterystyczna dla β -konfiguracji reszty D-GlcNAc. Proszę o wytłumaczenie.

9. W tekście pracy zaobserwowałam pewne potknięcia językowe i stylistyczne, a także przypadki użycia żargonu laboratoryjnego, które jednak nie wpływają na końcową ocenę i na wysoką wartość merytoryczną całej rozprawy.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Stanowi dowód szerokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w zakresie mikrobiologii i immunochemii. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Karoliny Ucieklak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, jej wkład w przeprowadzone badania, po opublikowaniu wyników tych badań, bądź po uzyskaniu zgłoszenia patentowego, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr. Karoliny Ucieklak stosowną nagrodą.



dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS

