



Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski

19.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „**Badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej z bakteryjnym białkiem OmpC jako markerem humoralnych niedoborów odporności**”

Mgr Piotr Naporowski

Praca doktorska wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
Promotor: dr hab. Danuta Witkowska

Białka błony zewnętrznej (ang. Outer Membrane Protein, OMP) bakterii Gram-ujemnych są intensywnie badane ze względu na swoją funkcję adhezyn, receptorów dla bakteriofagów, zaangażowania w procesy transportu, czy udziału w reakcjach enzymatycznych. Niezwykle aktualnym nurtem badawczym, w kontekście patogenezы bakterii Gram-ujemnych, są badania nad OMP uczestniczącymi w interakcjach z układem immunologicznym i ich zaangażowaniem w aktywację np. kaskady białek układu dopełniacza, czy funkcję ochronną. Należy także wspomnieć o innym, jakże ważnym nurcie badawczym dotyczącym OMP, tj. badań nad markerami diagnostycznymi czy szczepionkami. Wybór tematyki rozprawy doktorskiej uważam zatem za aktualny, interesujący i ważny naukowo.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 156 stron i ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W układzie i treści pracy wyróżnione zostały: *Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Bibliografia, Wykaz tabel i rycin, Wykaz skrótów* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Doktorant umieścił w pracy także spis swoich osiągnięć i działalności naukowej. Mgr Piotr Naporowski ma w swoim dorobku 2 prace przeglądowe, 5 prac oryginalnych, 5 streszczeń zjazdowych oraz udział w 3 projektach badawczych. Należy podkreślić, iż Doktorant angażował się także w działalność popularyzującą naukę oraz działalność organizacyjną na rzecz IITD PAN, a za swoje zaangażowanie otrzymał nagrody Dyrektora IITD PAN, w tym nagrodę zespołową za



opublikowanie pracy oryginalnej o najwyższym współczynniku IF w kategorii „wiodąca rola IITD PAN”.

Wstęp jest dobrze przygotowanym opracowaniem potwierdzającym wiedzę i przygotowanie Doktoranta do tematyki realizowanej pracy doktorskiej. We *Wstępie* Autor omawia podstawowe wiadomości dotyczące układu odpornościowego, a także dokonuje charakterystyki odporności wrodzonej (nieswoistej) oraz nabytej (swoistej). Interesującym rozdziałem jest ten dotyczący pierwotnych niedoborów odporności, w którym Autor dokonuje ich klasyfikacji w oparciu o dane Międzynarodowej Unii Towarzystw Immunologicznych. W rozdziale pt. „Zakażenia bakteryjne towarzyszące niedoborom immunologicznym”, omówione zostały patogeny będące czynnikami etiologicznymi zakażeń występujących u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności. W kolejnych rozdziałach pracy przedstawiono budowę osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych ze szczególnym uwzględnieniem OMP, w tym informacje dotyczące reaktywności OMP pałeczek *Shigella flexneri*. W części teoretycznej rozprawy Autor podnosi także problem suplementacji immunoglobulin u pacjentów z niedoborami odporności. Zakres tematyczny *Wstępu* wskazuje, iż praca jest nie tylko osadzona w obszarze badań podstawowych z zakresu immunologii i bakteriologii, ale ma także wymiar aplikacyjny, zarówno w kontekście opracowywania odpowiedniego testu diagnostycznego do oznaczania humoralnych niedoborów odporności jak i preparatu immunoglobulinowego, mogącego mieć zastosowanie w suplementacji przeciwciał u pacjentów z niedoborami odporności. Na wyróżnienie tej części pracy zasługują czytelnie przygotowane tabele. Należy także zaznaczyć, iż *Wstęp* czyta się bardzo dobrze, Autor w czytelny i interesujący sposób przedstawił zagadnienia teoretyczne związane z tematyką swojej pracy doktorskiej.

Pytania i uwagi do tej części rozprawy doktorskiej:

- Pisząc o czynnikach zjadliwości bakterii, Autor wymienia tylko proteazy, toksyny oraz cząstki sygnalizacyjne. Poproszę o rozwinięcie i poszerzenie tego zagadnienia w odniesieniu do *S. flexneri*. Jakie inne istotne czynniki wirulencji Doktorant może jeszcze dodać do przygotowanego opisu?
- Jakie kryterium przyjął Autor wybierając rodzaje bakterii umieszczone w tabeli nr 5, zatytułowanej: „Najważniejsze bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*”? Warto w tym punkcie dodać, iż obecnie do rzędu *Enterobacterales* ord. nov wprowadzono nowe rodziny, zatem część wymienionych rodzajów bakterii zostało wyłączonych z



rodziny *Enterobacteriaceae* (na podstawie Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 5575–5599 (2016));

- W rozdziale *Wstęp* zabrakło mi bardziej szczegółowego przeglądu literatury dotyczącego białka OmpC u *Enterobacterales*, szczególnie w odniesieniu do jego różnych funkcji w komórce bakterii, co powiązane jest z zagadnieniami wskazywania na OMP jako potencjalne biomarkery;
- Obecnie, raczej bardziej poprawnym określeniem jest „mikrobiota” niż „mikroflora”.

Przedstawiona do recenzji praca, jest kontynuacją wieloletnich badań nad białkami powierzchniowymi bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, prowadzonych w IITD PAN we Wrocławiu przez Panią dr hab. Danutę Witkowską, Promotorkę pracy doktorskiej oraz współpracujących badaczy. Zespół badawczy z IITD PAN we Wrocławiu opublikował wiele cennych prac oryginalnych oraz przeglądowych, w tematyce której dotyczy rozprawa doktorska mgr Piotra Naporowskiego, zatem praca Doktoranta w tak doświadczonej grupie badawczej z pewnością była niezwykle cenna dla samego Doktoranta, z punktu widzenia Jego rozwoju naukowego, jak i kontynuacji już wcześniej prowadzonych badań w tej jednostce. W dysertacji Autor często odwołuje się do wcześniejszych wyników Zespołu i na tej podstawie formułuje cele swoich badań. Takie przedstawianie badań własnych w odniesieniu do badań Zespołu, uważam jako bardzo dojrzałe i godne podkreślenia i wyróżnienia.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie reaktywności i oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał anty - OmpC *Shigella flexneri* 3a w surowicach krwi osób zdrowych i pacjentów z niedoborami immunologicznymi. Badania prowadzone były z użyciem natywnego białka OmpC pozyskanego z *S. flexneri* 3a, białka OmpC rekombinowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*, koniugatu peptydu cyklicznego i liniowego z BSA (albumina surowicy wołowej). Doktorant pracował także nad optymalnymi warunkami izolacji swoistych przeciwciał anty - OmpC z ludzkiej krwi obwodowej zdrowych dawców oraz postawił sobie za cel charakterystykę immunochemiczną przeciwciał, a także sprawdzenie ich właściwości ochronnych na modelu zwierzęcym. Wszystkie cele postawione w pracy doktorskiej zostały zrealizowane.

Materiały i metody opracowane zostały z dużą starannością. Autor szczegółowo opisuje materiały wykorzystywane w pracy doktorskiej, w tym szczep bakterii i warunki jego hodowli, syntetyczne peptydy zawierające epitop wiążący białka OmpC oraz zwierzęta wykorzystane w badaniach modelowych. Analizując wyniki, jakie powstały w oparciu o



przedstawioną w pracy metodykę należy stwierdzić, iż Doktorant opanował zaawansowane techniki z obszaru mikrobiologii, immunologii, proteomiki oraz biologii molekularnej.

W pracy zastosowano także metody statystyczne. Na uwagę zasługują czytelne tabele, które dopełniają opisy metodyczne i ułatwiają ich analizę.

Pytania do tej części rozprawy doktorskiej:

- W oparciu o zaproponowaną metodologię ekstrakcji białek błony zewnętrznej, jak Autor ocenia skuteczność stosowania opisywanych w literaturze i stosowanych przez innych badaczy, różnych detergentów, w tym zwitterjonowych do ekstrakcji białek OMP?
- Jak Autor uważa, czy zastosowaną w pracy metodę ekstrakcji białek błony zewnętrznej wg Arcidiacono i wsp. można zastosować także dla izolacji innych niż OmpC białek błony zewnętrznej, w celu ich późniejszego wykorzystania do badań immunologicznych?

Przedstawienie i omówienie wyników otrzymanych w pracy doktorskiej chciałabym wyróżnić. Autor bardzo precyzyjnie, opisując kolejne etapy pracy eksperymentalnej, wizualizuje wyniki na czytelnych rycinach i zestawia w tabelach i na wykresach, dokonuje obszernych opisów, które momentami mają charakter dyskusji. Zapoznając się z tą częścią dysertacji, nasuwa się myśl, iż powinny owe fragmenty znaleźć się w rozdziale pt. *Dyskusja*, ale po zapoznaniu z całością tego rozdziału, stwierdzam, iż wydają się być słusznie umieszczone właśnie w tym miejscu pracy, w bezpośrednim odniesieniu do wyników.

Autor rozprawy wykonał ekstrakcję białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a, dokonał oczyszczenia białka OmpC stosując filtrację żelową oraz chromatografię jonowymienną. Efekt tych prac w postaci homogenego preparatu białka OmpC potwierdzono stosując technikę elektroforezy oraz wykonując Western Blot. Biorąc pod uwagę trudności metodyczne jakie występują w pracy z białkami OMP, otrzymany wynik uznać należy za satysfakcjonujący. Czytelnie został opracowany rozdział dokumentujący wyniki dotyczące koniugacji peptydów z białkiem nośnikowym. Analizując wyniki uzyskane przez Doktoranta chciałabym szczególnie podkreślić wkład włożony w pracę nad otrzymaniem i oczyszczeniem rekombinowanego białka OmpC. Ten rozdział pracy ma cenne walory metodyczne. Obserwacje jakie poczynił Doktorant mogą zostać wykorzystane w odniesieniu do badań prowadzonych na białkach OMP innych bakterii Gram-ujemnych. Wyniki pokazujące reaktywność i miana przeciwciał anty-OmpC surowicy ludzkiej z wybranymi antygenami przedstawiono na czytelnych wykresach oraz w równie

czytelnych tabelach. Dopełnieniem badań zaproponowanych przez Doktoranta są badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Uzyskane w tej części pracy doktorskiej wyniki uważam za bardzo interesujące.

Pytania do rozdziału *Wyniki*:

- Jaki został zastosowany klucz do nadania numeracji frakcjom preparatu białkowego, przedstawionym na rycinie 8? Czym różnią się między sobą frakcje: 9-17 oraz 22-23?
- W części badań dokumentujących uzyskanie swoistych przeciwciał anty – OmpC z użyciem chromatografii powinowactwa do immobilizowanego białka OmpC na kolumnie ze złożem Sepharose Cl-4B Autor pisze, iż z jednokrotnej izolacji przeciwciał przy użyciu 500 µl surowicy uzyskano 600 µl przeciwciał anty-OmpC, natomiast w tabeli nr 11 wskazane jest, iż była to objętość 250 µl surowicy. Proszę o doprecyzowanie tej informacji. Dodatkowo proszę o komentarz, jak Doktorant rozumie określenie: „objętość wyizolowanych przeciwciał”?

Dyskusja jest zwięzłym przeanalizowaniem własnych wyników badań w odniesieniu do prac innych badaczy, szczególnie wcześniejszych prac Zespołu z IITD PAN. Dyskusja kończy się zestawieniem tabelarycznym podsumowującym wyniki badania reaktywności wybranych antygenów z przeciwciałami surowicy ludzkiej/mysiej. Bibliografia zawiera 136 pozycji aktualnej, dobrze dobranej literatury.

Wnioski pracy doktorskiej zostały zebrane w pięciu syntetycznych punktach. Efektem pracy doktorskiej są nie tylko cenne obserwacje metodyczne, ale również wyniki dające podstawy do opracowania komercyjnego testu serologicznego do oznaczania niedoborów swoistych przeciwciał. Dodatkowo wykazano, iż w surowicach dzieci z pierwotnymi niedoborami immunologicznymi oraz z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych występują niższe średnie miana przeciwciał klasy IgA w porównaniu do grupy kontrolnej. Daje to podstawę do możliwości opracowania terapeutyku do suplementacji niedoborów przeciwciał. Autor rozprawy stwierdził także, iż reaktywność bakteryjnego natywnego białka OmpC, otrzymanego na drodze ekstrakcji z błony zewnętrznej *S. flexneri* 3a w porównaniu do innych testowanych antygenów dała najlepsze wyniki. Autor wnioskuje możliwość wykorzystania białka OmpC do testów immunoenzymatycznych, dodatkowo potwierdził właściwości immunostymulacyjne i ochronne OmpC na modelu mysim.

- Poproszę zatem Doktoranta o wskazanie, jakie widzi perspektywy w opracowaniu komercyjnego testu serologicznego do oznaczania swoistych przeciwciał anty-



OmpC oraz terapeutyku do suplementacji w przypadku humoralnych niedoborów odporności?

Podsumowując stwierdzam, iż praca doktorska mgr Piotra Naporowskiego spełnia wszystkie wymagania jakie stawia się eksperymentalnym pracom doktorskim. Mgr Piotr Naporowski zrealizował postawione w pracy doktorskiej cele, przeprowadził szereg cennych i pracochłonnych eksperymentów uzyskując ważne naukowo wyniki. Wykazał się znajomością wielu technik z zakresu mikrobiologii, immunologii oraz biologii eksperymentalnej, opracował, zinterpretował i przedyskutował prawidłowo wyniki, które stanowią podstawę do możliwych zastosowań praktycznych.

Rozprawa doktorska mgr Piotra Naporowskiego pt. „**Badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej z bakteryjnym białkiem OmpC jako markerem humoralnych niedoborów odporności**” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. 2017, poz.1789). Zwracam się także do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy, ze względu na ważny wkład naukowy do dyscypliny nauki biologiczne oraz istotne wyniki, mogące mieć zastosowanie aplikacyjne.

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
Gabriela Bugła-Płoskońska
prof. dr hab. Gabriela Płoskońska