

Dr hab. Dominika Drzewiecka

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

RECENZJA

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

Praca doktorska Pani mgr Darii Artyszuk została wykonana w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jolanty Łukasiewicz, w ramach studiów we Wrocławskiej Szkole Doktorskiej Instytutów Polskiej Akademii Nauk. Recenzja przedstawionej pracy została wykonana w odpowiedzi na pismo Pana prof. dra hab. Andrzeja Gamiana, Dyrektora IiTD PAN we Wrocławiu, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu z dn. 14 grudnia 2023 r. Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim, w którym jej tytuł brzmi: „O antigen structural studies and O loci identification of nontypeable clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*”. Ma ona budowę typową dla naukowych prac doświadczalnych, a więc obejmuje Wstęp teoretyczny, wprowadzający w zagadnienia związane z tematem pracy i stanowiący tło dla jej Celów, a kolejne rozdziały odnoszą się do przeprowadzonych badań, a więc są to Materiały i metody, a także Wyniki i ich omówienie w postaci Dyskusji i Wniosków. Rozprawa zawiera także streszczenia w językach polskim i angielskim, listy skrótów, referencji, tabel i rycin, a także wykaz dobrych osiągnięć naukowych Doktorantki w postaci trzech publikacji naukowych (dwie oryginalne i jedna przeglądowa), pięciu ustnych prezentacji wyników i jednej plakatowej w języku angielskim na międzynarodowych konferencjach naukowych oraz udziale w realizacji projektu grantowego, finansowanego przez NCN w ramach konkursu OPUS 16.

We Wstępie rozprawy Pani mgr Daria Artyszuk skupia się na scharakteryzowaniu pałeczek *Klebsiella pneumoniae* zwłaszcza w kontekście ich chorobotwórczości. Bakterie te

zaliczono do tzw. grupy ESKAPE – patogenów krytycznych stanowiących szczególne zagrożenie ze względu na ich rosnącą wielolekooporność. Doktorantka zwraca uwagę na rosnące znaczenie wariantów hiperwirulentnych *K. pneumoniae*, a także bardzo niepokojących klonów całkowicie opornych na stosowane antybiotyki. Omawia poszczególne czynniki chorobotwórczości *K. pneumoniae*, w tym wielocukry powierzchniowe budujące otoczkę, czasem niezwykle obfitą i nadającą szczepom śluzowaty charakter oraz lipopolisacharyd (LPS), stanowiący przedmiot badań recenzowanej rozprawy. Tej ważnej części Autorka, co rozumiała, poświęca najwięcej uwagi, zwłaszcza w aspekcie jej budowy chemicznej i aktywności endotoksycznej. Część wielocukrowa LPS, czyli antygen O, jest u pałeczek *K. pneumoniae* stosunkowo mało zróżnicowana w porównaniu do innych bakterii Gram-ujemnych, a także w porównaniu do różnorodności (około osiemdziesięciu poznanych typów) antygeny otoczkowego K tych pałeczek. Opisano bowiem do tej pory tylko kilkanaście serotypów O *K. pneumoniae*, charakteryzujących się stosunkowo prostą budową, określając ich strukturę chemiczną lub podstawy molekularne potencjalnego fenotypu, w oparciu o analizy klastrów genów warunkujących syntezę antygenów O, co Doktorantka szczegółowo opisuje. W tej właśnie niewielkiej liczbie wariantów antygeny O upatruje Ona możliwości opracowania strategii terapeutycznych przeciwko infekcjom powodowanym przez *K. pneumoniae*, któremu to zagadnieniu poświęca ostatnią część Wstępu. Podrozdział ten dotyczy właściwie strategii zapobiegania infekcjom, czyli konstrukcji szczepionek koniugatowych, skierowanych m.in. przeciwko najbardziej rozpowszechnionym antygenom O. Z tym zagadnieniem związane są jasno sprecyzowane Cele pracy doktorskiej, czyli analiza struktury chemicznej polisacharydów O-swoistych i genów związanych z biosyntezą tych struktur dla wybranych, unikalnych serologicznie szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, a także określenie częstości występowania determinant genetycznych analizowanych serotypów O wśród genomów tych bakterii, na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych. Oba rozdziały wprowadzające są ilustrowane ładnymi rycinami uzupełniającymi przedstawione treści.

Metody opisano klarownie, podając czasem nawet zbyt dokładne szczegóły techniczne (użyto czystej szklanej probówki, pipety, penicylinówki itp.). Dobór metod uważam za adekwatny do postawionych celów pracy i zadań badawczych, są one oparte na dobrych

referencjach, wypracowane i sprawdzone w zespole badawczym, w którym pracowała Doktorantka.

Pierwszą część Wyników stanowią badania wstępne, których skutkiem było podzielenie badanych szczepów na cztery grupy podobieństwa na podstawie badań struktury i elektroforezy LPS w żelu poliakrylamidowym oraz analiz bioinformatycznych, w oparciu o sekwencjonowanie całogenomowe. Następnie Autorka w kolejnych podrozdziałach przedstawia wyniki kompleksowych badań strukturalnych, genetycznych i bioinformatycznych, prowadzących do ustalenia fenotypu i genotypu antygenów O szczepów z czterech wskazanych wstępnie grup. Pierwsza grupa reprezentuje częsty serotyp O2, a Doktorantka analizuje ponadto częstość jego występowania i wpływ różnych sekwencji insercyjnych na zmienność antygenów O2 i O1. Wyniki tych badań zostały opublikowane (Artyszuk i in. 2020). Druga grupa reprezentuje serotyp O13, którego struktura chemiczna i częstość występowania zostaje oznaczona w niniejszej pracy, a wyniki te także opublikowano (Artyszuk i in. 2024). Dla szczepów z trzeciej grupy zarówno analizy chemiczne ich LPS, jak i badania klastrów genów odpowiadających za syntezę antygenów O w genomach wskazały na serotyp O4, przy czym wykazano, że szczep wzorcowy O4 jest *de facto* przedstawicielem gatunku *Enterobacter cloacae*, co mogło być przyczyną początkowych trudności z typowaniem serologicznym. Szczepy z ostatniej, czwartej grupy, okazały się prezentować fenotyp szorstki, pozbawiony części O-swoistej LPS, choć genotyp wskazywał na potencjalną serogrupę O1, jednak brak jednego z genów (*wbbO*) w obrębie klastra uniemożliwiał ekspresję i syntezę tego antygeny. Wyniki są dobrze przedstawione i udokumentowane odpowiednimi rycinami oraz tabelami, a w kolejnym rozdziale Dyskusja omówione na tle licznie cytowanych artykułów naukowych. Doktorantka podkreśla wagę uzyskanych wyników m.in. w kontekście praktycznego wykorzystania narzędzi bioinformatycznych do badań epidemiologicznych *K. pneumoniae*, możliwości wykorzystania wiedzy o budowie najczęściej występujących serotypów O w konstrukcji szczepionek odpornościowych czy też wpływu, bardzo często obecnych w genomach badanych pałeczek, różnego typu sekwencji insercyjnych na ich zmienność fenotypową (zróznicowanie antygenów O) w kontekście chorobotwórczości i możliwości ewazji. Dyskusję poprowadzono bardzo dobrze, odnosząc się do wszystkich uzyskanych wyników, analizując ich wagę, znaczenie, a także wyjaśniając źródła i powody

napotkanych trudności czy wątpliwości. W rozdziale Wnioski Autorka w punktach wskazuje najistotniejsze osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Spis referencji obejmuje 120 prac naukowych, dobrze związanych z poszczególnymi aspektami ocenianej rozprawy, a więc z jej teoretycznymi podstawami, metodyką, jak i uzyskanymi wynikami, dla których stanowią punkt odniesienia. Szczególnie ważne są tu publikacje Autorki rozprawy, zawierające większą część wyników prezentowanych w pracy.

Poniżej zamieszczam uwagi i pytania, odnoszące się do poszczególnych części rozprawy.

We Wstępie, który jest tematycznie dobrze związany z podjętymi badaniami i stanowi tło i uzasadnienie dla założonych celów pracy, moim zdaniem zabrakło podstawowych wiadomości o przedmiotowych pałeczkach, takich jak ich przynależność taksonomiczna, cechy metaboliczne czy rezerwuary i naturalne środowiska występowania. Także opis budowy LPS jest ogólny i pozostawia pewien niedosyt, np. opisano budowę lipidu A *Escherichia coli*, ale nie wskazano jakie kwasy tłuszczowe występują u *K. pneumoniae*, nie widać też na Ryc. 4 anonsowanych podstawników w lipidzie A, odpowiedzialnych za wrodzoną oporność tych bakterii na polimyksyny. Rycina 6 wśród poznanych wcześniej struktur antygenów O *K. pneumoniae* ukazuje strukturę antygeny O13, której określenie jest wynikiem recenzowanej rozprawy, ale nie uwzględnia opisanego wcześniej antygeny O8, natomiast ryc. 7, choć ma prezentować dwanaście poznanych klastrów biosyntezy antygeny O, ukazuje ich tylko dziewięć. Jak Pani mgr Artyszuk mogłaby się odnieść do problemu maskowania antygenów O przez antygeny K w kontekście konstrukcji szczepionek anty O-swoistych, na który to problem zwróciła uwagę we Wstępie?

W rozdziale Materiały i metody brak wprowadzenia czy opisu do Tabeli 1. Nie jest to jasno zaznaczone dlaczego w tabeli 2 wymieniono jako badane dwanaście szczepów *K. pneumoniae*, ale opisano pochodzenie tylko ośmiu z nich, a we wstępnych badaniach uwzględniono jedenaście, choć DNA izolowano z dziesięciu. W rozdziale tym temperaturę podawano zamiennie w °C albo K, izotop wodoru oznaczano jako ²H lub D, co powinno być ujednolicone.

W rozdziale Wyniki niepotrzebnie powielono w tekście legendę tabeli 4. W tabelach czy rycinach, obejmujących dane dla wielu szczepów, takich jak np. tabela 6 i rycina 14, dobrze

byłoby wskazać (zaznaczyć) szczepy badane czy omawiane grupy, aby łatwiej było śledzić tok wywodów. Proszę o wyjaśnienie – dlaczego nie wykonano rozdziału elektroforetycznego i srebrzenia w żelu LPS szczepu Kp177, jako jedynego wśród dziesięciu analizowanych? Na jakiej zatem podstawie uznano go na tym etapie za szczep fenotypowo szorstki w rozdziale elektroforetycznym (tabela 4), podobnie jak szczep Kp174, który w SDS-PAGE wykazał przecież obecność wolno migrujących w żelu długołańcuchowych cząsteczek LPS (uznanych potem w rozdziale 7.5.1 za zanieczyszczenie polisacharydem otoczkowym), a wstępna analiza bioinformatyczna wskazała na obecność w genomach obu szczepów klastrów genów kodujących antygen O1v1? Co ciekawe, w Dyskusji zamieszczono prawie identyczną jak tabela 4, podsumowującą wyniki tabelę 15, ale tu obu szczepom na podstawie rozdziału elektroforetycznego (sic!) przypisano fenotyp SR. Czy wykonywano inne testy S/R? Czy stosowano metody zapobiegające ekstrakcji LPS łącznie z polisacharydami otoczkowymi (zanieczyszczonych)? Chciałabym prosić Panią Doktorantkę o wyjaśnienia w tych kwestiach.

Drobne uwagi: Punkty wymienione w rozdziale 9. Conclusions są w istocie podsumowaniami, a nie wnioskami, które powinny być uogólnioną pochodną uzyskanych wyników. Chyba niesłusznie skupiono się tu na wynikach opublikowanych, a pominięto wyniki uzyskane dla dwóch serogrup O, których nie opublikowano. Przy kolejnym przytaczaniu nazwy drobnoustroju wystarczy skrót nazwy rodzajowej, nie trzeba już podawać całej nazwy, co zdarzało się wielokrotnie we Wstępie, a także w Dyskusji. Zauważono drobne błędy językowe i interpunkcyjne, a także typu: pomyłka w numerze tabeli (16 zamiast 15 – str. 96), inny rok publikacji w tekście i w spisie referencji (poz. 3), nieadekwatny podpis do ryciny 13 (brak symboli Kp181 i Kp167) czy określenie *wszystkich izolatów* – „all the isolates”, gdy chodziło tylko o dwa. Lista skrótów początkowo nie jest ułożona w kolejności alfabetycznej.

Należy też zwrócić uwagę na sposób cytowania. W niektórych przypadkach cytowane są nieadekwatne lub niezbyt aktualne referencje, np. w podrozdziale dotyczącym rdzenia LPS referencje pochodzą głównie z lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku i np. podając informację, że w przypadku *E. coli* zidentyfikowano tylko 5 typów rdzenia do tej pory, a dla *K. pneumoniae* dwa typy, Doktorantka odnosi się do publikacji z 1992 r. dotyczącej

struktury polisacharydów LPS u *Pseudomonas pseudomallei* (str. 34). Ponadto niepotrzebnie przytaczane są trzy nazwiska (zamiast skrótu odnoszącego się do współautorów) oraz całe imiona, co widoczne jest zwłaszcza w spisie referencji, zamiennie z inicjałami. Zauważono też tendencję do niekoniecznego już w rozdziale Wyniki przytaczania referencji dotyczących stosowanych metod, a dodatkowo są to nieraz inne publikacje niż podane w rozdziale Metody (np. w odniesieniu do ekstrakcji LPS czy analiz MLST). Z kolei w opisie ryc. 6, która pochodzi z publikacji (Artyszuk i in. 2024), brak referencji, nie podano ich też dla ryc. 1 i 3.

Chciałabym zwrócić uwagę na to, że chociaż Doktorantka powinna odnosić się do własnych publikacji, w których zawarła wyniki swoich badań opisywanych w rozprawie doktorskiej (Artyszuk i in. 2020, 2024), zwłaszcza jeśli zamieszcza rycinę czy tabelę z tych artykułów naukowych, to należałoby unikać przytaczania dosłownie mniejszych lub większych fragmentów tekstu z publikacji (zwłaszcza bez zamieszczenia tych prac jako referencji), co zdarza się zarówno w rozdziałach teoretycznych, jak i rozdziałach doświadczalnych, poświęconych opisowi opublikowanych już wyników, czyli Wynikach i Dyskusji. Być może nie jest łatwo opisywać te same wyniki innymi słowami, ale rozwiązaniem mogłoby być włączenie obydwu publikacji w skład rozprawy doktorskiej, co pozwoliłoby na uniknięcie tego problemu.

Mimo zamieszczonych uwag, które wynikają z mojego obowiązku jako recenzenta, oceniam recenzowaną rozprawę doktorską jako dobrze zaplanowaną, skonstruowaną i przeprowadzoną. Zakres badań jest ambitny i, co uważam za bardzo ważne, łączy w sobie różne metody określenia serotypu O szczepów klinicznych *K. pneumoniae* – metody fenotypowe, związane z określeniem struktury chemicznej antygenów O tych szczepów, w odniesieniu do wyników wcześniejszego typowania serologicznego (szczepy nietypowalne) oraz metody genotypowe i bioinformatyczne, dotyczące określenia podstaw molekularnych wytwarzania określonych polisacharydów, na podstawie sekwencjonowania całogenomowego i badań klastrów genów, kodujących wykryte fenotypy O. Ponadto szeroka analiza bioinformatyczna, mająca na celu określenie rozpowszechnienia analizowanych *loci* wśród sekwencji tysięcy genomów *K. pneumoniae* dostępnych w bazach danych, pozwoliła na potwierdzenie dominacji serogrup O1/O2 i wskazanie innych rozpowszechnionych antygenów O (O4 i nowo opisanego O13 – OL101) wśród klonalnie spokrewnionych

i niepokrewnych szczepów badanych bakterii. Wskazano także na pojawiające się różnice w obrębie analizowanych klastrów genów, spowodowane m.in. obecnością różnego typu sekwencji insercyjnych, a skutkujące np. brakiem syntezy polisacharydu O-swoistego, czyli fenotypem R. Takie holistyczne podejście – od genu do antygeny – pozwala na wielopłaszczyznową analizę zjawiska zróżnicowania antygenowego wśród pałeczek *K. pneumoniae* i może mieć również znaczenie praktyczne w kontekście zapobiegania infekcjom tymi bakteriami poprzez konstrukcję odpowiednich szczepionek.

Biorąc pod uwagę przedstawioną wyżej charakterystykę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Artyszuk, pt. „Badania strukturalne antygenów O i identyfikacja *loci* O nietypowalnych izolatów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*” oraz jakość naukową opisanych w niej wyników uważam, że **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1668 z późn. zm.)**. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dominika Drzewiecka