

Dr hab. Marcin Łoś, profesor nadzwyczajny UG
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 03.10.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka A. Harhali pt. "Immune epitopes of pneumococcal endolysins Cpl-1 and Pal and their role in shaping immunoreactivity of the enzymes" przygotowanej pod kierunkiem naukowym Promotora Prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma postać liczącej 110 stron monografii o strukturze typowej dla prac doświadczalnych. Składa się ona ze *Spisu treści, Listy rycin, Listy tabel, Spisu skrótów, Listy publikacji, Wstępu, Celu badań, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Streszczenia, Streszczenia w języku polskim oraz Bibliografii*. Praca napisana jest w języku angielskim. *Wstęp* bardzo dobrze zaznajamia czytelnika z podstawami tematyki badawczej. Spisy rycin i tabel byłyby bardziej przydatne, gdyby tytułom towarzyszyły też numery stron, na których dane ryciny i tabele się znajdują. Praca napisana jest klarownie i bardzo łatwo jest czytelnikowi zrozumieć zarówno wyniki doświadczeń, jak i cel ich przeprowadzenia. Praca składa się w spójną całość.

Mgr inż. Marek A. Harhala w przedkładanej rozprawie doktorskiej podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę badawczą jaką jest identyfikacja immunogennych epitopów w badanych endolizynach oraz próba modyfikacji ich immunogenności przez zmianę sekwencji epitopów. Jednocześnie oceniane były aktywności modyfikowanych endolizyn. Ocena aktywności odbywała się za pomocą opracowanej przez doktoranta metody, która znacznie zwiększała czułość pomiaru i tym samym pozwala na pomiar znacznie bardziej subtelnych zmian, niż byłoby to możliwe za pomocą dotychczasowo stosowanych testów.

Treść wstępu jest dobrze dobrana i stanowi bardzo dobrą teoretyczną podstawę, która pomaga czytelnikowi w interpretacji wyników części doświadczalnej. We wstępie omówione są różne aspekty wykorzystania białek w biologii i medycynie, potencjału lizyn bakteriofagowych jako leku przeciwbakteryjnego, struktury i działania badanych endolizyn (Cpl-1 i Pal) oraz roli bakterii *Streptococcus pneumoniae* w patogenezie. W dalszej części wstępu przybliżane są zagadnienia związane z odpowiedzią immunologiczną na leki białkowe oraz potencjalnych problemów, jakie ta odpowiedź może wywołać w trakcie terapii.

Cele pracy są jasno zdefiniowane, choć w części poświęconej ich zdefiniowaniu, brakuje mi przedstawienia tych celów w formie hipotez badawczych, które mają zostać przetestowane w trakcie pracy. Cele są postawione jako osiągnięcie pewnych kamieni milowych, co może być błędnie interpretowane, jako zwykłe zademonstrowanie w praktyce uprzednio przetestowanych hipotez badawczych. Nie jest to kwestia błędnych założeń, lecz raczej braku ich sformułowania z większym podkreśleniem roli testowania hipotezy na wybranych przykładach.

Dobór metod badawczych jest prawidłowy. Pozwoliły one osiągnąć zdefiniowane cele badawcze, oraz uzyskać niezwykle cenne i interesujące wyniki.

Dobór literatury i materiałów źródłowych świadczy o dobrej orientacji Doktoranta w temacie badań. W swojej pracy, mgr inż. Marek A. Harhala czerpie głównie z najnowszych dokonań naukowych. Cytowana literatura zawiera 83 pozycje.

Recenzowana praca jest starannie sformułowana, ale odnosi się wrażenie, że w ostatnich fazach edycji zabrakło Doktorantowi nieco czasu i nie została ona dokładnie sprawdzona przed złożeniem. Do tekstu przekradły się błędy edytorskie, takie jak na przykład błędnie przywołane ryciny na stronach 50 (jest odnośnik do ryciny 6 a powinien być do 3), 64 (jest odnośnik do ryciny 3 a powinien być do 64), czy w podpisie do ryciny na stronie 70 gdzie przywołano metodę „ELIS” zamiast ELISA. Niemniej jednak te, w sumie dosyć błahe, usterki pracy, nie podważają jej wartości.

Przystępując do oceny uzyskanych rezultatów, muszę przyznać, że pracę przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Porusza ona tematy, które wydały się mi bardzo interesujące i aktualne. Jednocześnie praca jest spójna i dobrze ustrukturyzowana, co znacznie ułatwia jej odbiór i zrozumienie zaprezentowanych w niej wyników.

Bardzo ważną częścią pracy, o dużym znaczeniu nie tylko w dalszych badaniach, lecz również w praktyce było opracowanie metody detekcji lizy komórek opartej na barwniku fluorescencyjnym. Barwnik ten, którego wiązanie się z dwuniciowym DNA można bardzo łatwo i wydajnie wykrywać, pozwala na konstrukcję nie tylko precyzyjnych testów laboratoryjnych, idealnie dostosowanych do badań przeprowadzanych w dobrze wyposażonym laboratorium nad tematyką prezentowaną w niniejszej pracy, ale również w szybkich testach diagnostycznych wykonywanych przy łóżku pacjenta, w znacznie mniej sprzyjających okolicznościach i przez słabiej wyszkolony personel.

Kolejne etapy pracy, wykorzystujące między innymi wyżej wzmiankowaną metodę, skupiały się na określeniu immunogenności badanych endolizyn Cpl-1, Pal i PlyC oraz określenia dokładnej lokalizacji immunogennych epitopów tych białek. Po identyfikacji immunogenności i mapowaniu epitopów na bazie surowicy z zaszczepionych w trakcie prac myszy, identyfikowane epitopy w białkach Pal i Cpl-1 zostały zmodyfikowane i białka o zmodyfikowanych epitopach zostały sklonowane, podane nadekspresji, oczyszczaniu i określeniu aktywności oraz reaktywności surowic względem zmodyfikowanych białek. Bardzo ciekawą obserwacją było ustalenie, że modyfikacje miejsc nawet dość odległych od domeny katalitycznej, miały często duży wpływ na aktywność białka. Zostało to, moim zdaniem prawidłowo, zinterpretowane jako potencjalna destabilizacja domeny katalitycznej przez zmianę struktury lub stabilności pozostałych domen. Zmodyfikowane białka zostały ocenione nie tylko pod kątem ich aktywności, ale również pod kątem ich immunogenności oraz zdolności surowic zwierząt zaszczepionych białkiem o pierwotnej sekwencji aminokwasowej, do neutralizacji modyfikowanych białek. W wyniku modyfikacji nie udało się wprawdzie znacząco zredukować immunogenności badanych białek, ale takie białka wykazywały w kilku przypadkach większą odporność na inaktywację przez surowice skierowane przeciw oryginalnym białkom, co pozwala na potencjalne użycie takich białek, jako kolejnych dawek terapeutycznych na przykład w przypadku dłuższej terapii, która może wiązać się z wystąpieniem reakcji immunologicznej na podawany preparat.

Szczególnie interesującą częścią pracy było zbadanie potencjalnej indukcji reakcji immunologicznych w postaci indukcji IgE, odpowiedzi zapalnej lub aktywacji układu dopełniacza. Istotne również było ustalenie wpływu na profile ekspresji genów w hodowlach komórkowych. Nie stwierdzono występowania efektów, które mogłyby potencjalnie świadczyć o ryzykach związanych ze stosowaniem badanych białek jako białek terapeutycznych.

Zaprezentowana mi praca w sposób bardzo syntetyczny przedstawia osiągnięte wyniki, przy czym kolosalna część wkładu pracy doktoranta odbyła się niejako w tle. Wszystkie prace wymagające oczyszczenia dużej ilości różnych białek, klonowania i ekspresji kodujących je genów i dużej ilości pracy bioinformatycznej, mającej na celu ustalenie, które z wariantów są najkorzystniejsze i dają największe szanse powodzenia, prowadzone są na podbudowie dużej ilości pracy włożonej w same przygotowanie finalnego doświadczenia. W związku z tym, tym bardziej powinna prezentowana praca zostać doceniona.

Wyniki pracy zostały dobrze przedyskutowane, choć nie jestem w stanie do końca się zgodzić z niektórymi wnioskami. Myślę, że niektóre wnioski zostały sformułowane zbyt dobitnie. Na przykład nie mogę w pełni zaakceptować twierdzenia, że użycie badanych białek nie aktywuje IgE. Zgodziłbym się z twierdzeniem, że w przeprowadzonym doświadczeniu takiej aktywacji nie stwierdzono, lecz nie jest wykluczone, że w innych przypadkach taka aktywacja może zajść. Chciałbym przypomnieć doktorantowi, że brak dowodu nie jest dowodem braku, a doświadczenia, które prowadzimy są niczym innym, jak ciągłym testowaniem hipotez. I w związku z tym należy wyniki tych doświadczeń nieco ostrożniej formułować.

Wyniki przedstawionej mi do oceny pracy zostały opublikowane w trzech artykułach w solidnych czasopismach „Viruses”, „Frontiers in Microbiology” i „Antibiotics”. Jest to naprawdę porządny dorobek, który kwalifikowałby się do rozprawy w formie zbitki artykułów opatrzonej stosownym komentarzem i dyskusją.

Chciałbym jeszcze od siebie dodać, że wielokrotnie miałem okazję spotkać mgr inż. Marka A. Harhalę na wielu konferencjach poświęconych tematyce fagowej i być świadkiem tego, z jaką uwagą śledził prezentowane na tych konferencjach prace.

Na koniec chciałbym zadać Doktorantowi pytanie:

Czy zmapowane epitopy odpowiedzialne za immunogenność są skupione w jakiś konkretnych rejonach badanych białek na ich trójwymiarowej strukturze, czy raczej rozsiane w przypadkowych miejscach? Jeśli są one skupione, czy możliwe byłoby dołączenie jakiejś domeny, o której wiemy, że nie jest immunogenna (np. kawałka ludzkiej albuminy), tak, żeby zasłonić region immunogeny?

Wnioski końcowe

W oparciu o dokonaną analizę treści przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka A. Harhali pt. "Immune epitopes of pneumococcal endolysins Cpl-1 and Pal and their role in shaping immunoreactivity of the enzymes" na podstawie zawartych w niej wyników i w odniesieniu do aktualnej wiedzy w temacie przedstawionych badań stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w zakresie nauk biologicznych. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Marka A. Harhali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w uznaniu dla wartości i aktualności zawartych w recenzowanej pracy wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej o stosowne jej wyróżnienie.