



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej
Dr hab. Monika Radlińska
m.radlinska@uw.edu.pl



Warszawa, 29 września 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Marka Harhali pt. „Epitopy endolizyn pneumokokowych i ich rola w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej na te enzymy” (ang. *Immune epitopes of pneumococcal endolysins Cpl1 and Pal and their role in shaping immunoreactivity of the enzymes*).

Rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej.

Przedłożona mi do recenzji dysertacja poświęcona jest trzem endolizynom, kodowanym przez bakteriofagi infekujące pneumokoka *Streptococcus pneumoniae*, które docelowo mają służyć w zwalczaniu tego patogenu. W ramach prac doświadczalnych opracowano nowatorską metodę badania aktywności bakteriolitycznej endolizyn, określono immunogenność wybranych jako cele badawcze endolizn Cpl-1, Pal oraz PlyC w modelu mysim i ludzkim, zidentyfikowano reaktywne regiony w tych białkach, oraz uzyskano warianty ze zmienionymi aminokwasami w endolizynach Cpl-1 i Pal, które charakteryzowały się inną reaktywnością immunologiczną i/lub aktywnością bakteriolityczną w stosunku do natywnych białek.

Narastająca antybiotykooporność patogennych bakterii narzuca konieczność poszukiwania nowych rozwiązań stanowiących alternatywę dla antybiotyków. Jednym z rozwiązań jest wykorzystanie bakteriofagów albo białek pochodzenia bakteriofagowego. Przykładem tych ostatnich są endolizyny, które degradować peptydoglikan ściany komórkowej podczas uwalniania wirionów potomnych z komórki bakteryjnego gospodarza. Wykazano, że endolizyny dodane do bakterii Gram-dodatnich wywołują lizę osmotyczną i w konsekwencji śmierć komórki. Użycie w terapii enzymów litycznych, zamiast całych fagów, ma szereg zalet m.in. nie niosą one ze sobą zagrożeń związanych z horyzontalnym transferem genów i w zasadzie niemożliwym jest aby bakterie uzyskały na nie odporność. Chociaż cząsteczki tych białek zawierają znacząco mniej epitopów, w porównaniu do wirionu faga, one także wchodzić w interakcje z układem odpornościowym ludzi i innych zwierząt. Dlatego poszukuje się takich endolizn lub ich zmodyfikowanych pochodnych, które miałyby niską immunogenność. Rozprawa doktorska mgr Harhali ściśle wpisuje się tę istotną, z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, tematykę.

Większość ujętych w rozprawie metod badawczych, wyników doświadczeń i ich dyskusji została już opublikowana w trzech artykułach naukowych, wymienionych przez mgr Harhalę na s.11 dysertacji. Są to:

- *Safety Studies of Pneumococcal Endolysins Cpl-1 and Pal*. Harhala *et al.* (2018), *Viruses*. 15;10(11):638.
- *DNA Dye Sytox Green in Detection of Bacteriolytic Activity: High Speed, Precision and Sensitivity Demonstrated With Endolysins*. Harhala *et al.* (2021). *Front Microbiol.*12:752282.
- *Immunogenicity of Endolysin PlyC*. Harhala *et al.* (2022) *Antibiotics (Basel)*.18;11(7):966.

Mgr Harhala jest pierwszym autorem w każdej z tych trzech prac.

Taka sytuacja, w której większość wyników ujętych w dysertacji została już opublikowana w bardzo dobrych czasopismach, a zatem pod względem merytorycznym i metodologicznym zostały już zweryfikowane i ocenione pozytywnie przez recenzentów wskazanych przez redakcję, jest bardzo

wygodna dla osoby recenzującej pracę doktorską. Są to też okoliczności bardzo przydatne dla autora rozprawy, pod warunkiem jednak, że umiejętnie połączy treści poszczególnych artykułów, tak aby tworzyły spójny i logiczny ciąg, od założeń do realizacji kolejnych kroków pracy badawczej. I tu z żalem stwierdzam, że ta sztuka nie w pełni się Autorowi udało.

SZCZEGÓŁOWA OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim. Ma układ typowy dla prac naukowych o charakterze doświadczalnym w naukach biologicznych. Rozprawa doktorska liczy 110 stron i zawiera 20 rycin oraz 3 tabele. Składa się na nią 14 rozdziałów, w tym Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe, Podsumowanie, Streszczenie (w j. polskim i angielskim) oraz Bibliografia. Tekst pracy poprzedzony jest Spisem treści, Spisem rycin, Spisem tabel, Wykazem zastosowanych skrótów oraz Spisem publikacji, których mgr Marek Harhala jest współautorem i których wyniki, jak wspomniałam wyżej, włączył do rozprawy. Bibliografia obejmuje 83 pozycje literaturowe. Pod względem swojej konstrukcji (układu) rozprawa jest poprawna. Tym niemniej mam uwagę do braku zorganizowania rozdziałów i podrozdziałów w listy wielopoziomowe (czyli takie, które mają kilka poziomów – na pierwszym poziomie punkty, które mają swoje podpunkty, te z kolei mogą mieć kolejne podpunkty). Jest to klasyczny układ stosowany w publikacjach naukowych czy pracach dyplomowych. Doktorant nie zastosował takiej organizacji, dlatego wygenerował wiele podrozdziałów o np. numerze 1 co utrudniało czytanie i zorientowanie się w prezentowanych treściach. Konsekwencją był też brak w tekście jakichkolwiek odniesień (odsylaczy) do już wykonanych eksperymentów czy użytych metod. Sugestie „patrz Materiały i metody”, gdzie czytelnik nie wie do którego z 22 podrozdziałów ma zajrzeć, były dość irytujące. Podobnie jak próby zorientowania się gdzie kończą się poszczególne etapy pracy badawczej w Wynikach (tu cyfry poszczególnych podrozdziałów były po prostu nieco mniejsze lub większe, ale i tak wielokrotnie powtórzyły się ciągi 1,2,3,4 itd.).

Tytuł pracy „Epitopy endolizyn pneumokokowych i ich rola w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej na te enzymy” jest bardzo ogólny i niezupełnie spójny z **głównym Celem**, którym było, jak wskazał Autor, uzyskanie takich wariantów dwóch endolizyn Cpl-1 i Pal, które, nie tracąc swych bakteriolytycznych właściwości, byłyby mniej podatne na działanie specyficznych przeciwciał. Ten cel miał być realizowany w pięciu etapach, co faktycznie się stało, chociaż ich realizacja miała nieco inną kolejności niż podano w Celu.

Ku mojemu zaskoczeniu w Wynikach ujęto też opis doświadczeń, w których zbadano dodatkowo trzecią endolizynę PlyC. PlyC, będąc endolizyną pozostaje w zgodzie z tytułem rozprawy, ale niewymienienie jej w Celu pracy budzi wątpliwości dotyczące zasadności użycia PlyC jako modelu badawczego w rozprawie. Również w samych Wynikach Autor nie dodał żadnego wyjaśnienia dlaczego obok endolizyn Cpl-1 i Pal, zniemacka pojawiają się wyniki doświadczeń dla PlyC, dlaczego to właśnie białko zostało na tym etapie włączone do analiz.

Trzeba też podkreślić, że uzyskane rezultaty dla endolizyny PlyC nie zostały przedyskutowane w rozdziale „Dyskusja” ani ujęte w rozdziale „Wniosków końcowych” ani w „Streszczeniu”. PlyC nie jest też w ogóle wspomniana we Wstępie. W trakcie opisu Wyników (s. 79) pojawia się natomiast, wyjaśnienie przyczyny wyłączenia PlyC z dalszych prac badawczych (powód: różna reakcja surowicy ludzkiej i mysiej na poszczególne domeny tego białka), co oczywiście uznaję za właściwe. Z drugiej strony może byłoby lepiej, gdyby ta uwaga podana byłaby dużo wcześniej, bo w niektórych doświadczeniach opisanych na stronach 71-78, PlyC nie jest w ogóle używana (bez uzasadnienia dlaczego). Albo jest wynik zobrazowany na rycinie, natomiast nie jest on omówiony (ryc. 12, s.74). Albo podpis pod rysunkiem sygnalizuje prezentację wyniku dla PlyC (ryc. 11 s.73), ale go ostatecznie nie ma na tej rycinie

Chciałabym prosić mgr Harhałę o wyjaśnienie i uzasadnienie tych rozbieżności między tytułem, celem a treścią wyników, w odniesieniu do użytych modeli badawczych. Prosiłabym też o podanie jaka jest, zdaniem Autora, faktyczna rola endolizyn pneumokokowych w tworzeniu odpowiedzi odpornościowej na te enzymy. Takich zdań podsumowujących zabrakło mi w rozprawie.

Wstęp pracy (11 stron) jest w mojej opinii dość ubogi jeśli chodzi o wprowadzenie do tematyki. W pierwszym podrozdziale Doktorant omawia problemy związane z projektowaniem białek. Chociaż rozważania Autora nad liczbą kombinacji sekwencji nawet krótkiego białka, która jest ogromna (wykraczająca poza liczbę dostępnych atomów we Wszechświecie), są prawidłowe, chciałabym zaznaczyć, że badacze rzadko projektują białka *de novo*, zazwyczaj korzystają z już istniejących, których właściwości co najwyżej chcą przystosować do pożądaných celów. Tak jak robi to sam Autor starając się uzyskać warianty endolizyn mniej immunogenne. Trzeba też zaznaczyć, że znacznie większy problem, o którym w zasadzie Autor nie wspomina, jest sama selekcja. Gdybyśmy nawet byli w stanie uzyskać ogromną ilość wariantów danego białka (czasem jesteśmy np. przy użyciu mutagenезы losowej), problemem staje się konieczność ich selekcji czy testowania. I tu kluczowe stają się pomysłowe metody, które te problemy rozwiązują. Propozycję metody badawczej do testowania wariantów białek w celu znalezienia takich, które mają pożądanę właściwość, proponuje sam Autor prezentując w dysertacji swoje wyniki. Powiązanie problemu (tj. niedoboru skutecznych metod selekcji) z jego rozwiązaniem (proponowaną przez Doktoranta nową metodą), w mojej opinii działałoby na korzyść Autora i wspierało zasadność podjętego zadania badawczego i podnosiło jego znaczenie aplikacyjne, natomiast nie zostało to w ogóle wspomniane we Wstępie.

W kolejnych, **bardzo krótkich** podrozdziałach Wstępu, Doktorant wspomina o endolizynach, które mogą być wykorzystane jako enzybiotyki (czyli lityczne enzymy pochodzące z bakteriofagów lub bakterii, głównie z grupy hydrolaz peptydoglikanowych), o ścianie komórkowej bakterii, która jest celem ich aktywności enzymatycznej, endolizynach Cpl-1 i Pal, o patogennej bakterii *Streptococcus pneumoniae* i przeciwciałach IgG, które neutralizują obce białka. Natomiast zabrakło we Wstępie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego enzybiotyków, w szczególności ich użycia (np. w badaniach klinicznych) czy ich komercjalizacji. Wzmianka o rozpoczęciu badań klinicznych 2 fazy endolizyny SAL-1 i pierwszej fazy SAL200 pojawia się dopiero w pierwszym akapicie Dyskusji. Lokalizacja tej informacji w sekcji Dyskusja jest tym bardziej niezrozumiała, gdyż nie została połączona z jej ciągiem dalszym

Wspomnienie endolizyn Cpl-1 i Pal we Wstępie jest tak minimalistyczne, że nawet nie podano jakie fagi kodują te białka. Nie ma słowa o trzeciej endolizynie PlyC użytej jako model w pracach badawczych (a tu szczególnie przydałyby się wyjaśnienia dotyczące jej dwudomenowej budowy, masy molekularnej etc. które wielokrotnie są przywoływane w Wynikach jako uzasadnienie podjętych kroków). Nie przedstawiono aktualnego stanu wiedzy związanego z antybiotykoopornością szczepów *Streptococcus pneumoniae* czy prób użycia bakteriofagoterapii w zwalczaniu tego patogenu. Gdyby takie treści znalazły się we Wstępie po pierwsze w sposób systematyczny zaznajomiłyby czytelnika z tematyką (szczególnie takiego, który na co dzień nie zajmuje się endolizynami i *Streptococcus pneumoniae*), a Wstęp powinien być kompendium wiedzy wprowadzającym do przedmiotu pracy doktorskiej. A po drugie i ważniejsze, w ten sposób zabrakło klamry spinającej Wstęp z Celem badań, co stanowiłoby uzasadnienie ich podjęcia. Trzeba przyznać, że pewne uzasadnienie dotyczące przyczyn prowadzących do opracowania nowej metody badania endolizyn pojawiają się w pierwszym podrozdziale Wyników, gdzie Autor opisuje dotychczas stosowane metody, wskazując ich wady. Ale te treści powinny były pojawić się we Wstępie, bo nie są wynikami Autora.

Chciałabym też zwrócić uwagę, że po raz pierwszy spotykam się z rozprawą doktorską, w której Wstępie nie ma żadnego rysunku. W recenzowanej pracy przydałyby się np. schematy budowy endo-

lizyn z zaznaczonymi funkcjonalnymi regionami.

Materiały i Metody W tej sekcji zostały przedstawione metody badawcze. Ich zasadniczą rolą jest umożliwienie zainteresowanym naukowcom powtórzenie opisywanej procedury. W dwóch przypadkach brakuje danych aby było to możliwe:

- brak sekwencji nukleotydowych starterów wykorzystanych w mutageniezie ukierunkowanej genów kodujących endolizyny,
- nie jest jasne jaka procedura została użyta do oczyszczania poszczególnych białek. Określenia: „For experiments not including endolysin variant proteins” oraz „Cpl-1 and Pal (both WT and variants) for experiments including variants (...)” są dla mnie niezrozumiałe i sprzeczne.

Wyniki. Pierwszym opisanym w tej sekcji zadaniem (drugi punkt Celu pracy) było opracowanie metody do badania bakteriologicznej aktywności endolizyn, która wykorzystywała barwniki fluorescencyjne DNA (konkretnie SYTOX Green). Liza komórki bakterii, wywołana działaniem endolizyny, umożliwia wejście barwnika do komórki, co skutkuje wzbudzeniem sygnału. Podobny efekt mam miejsce także gdy DNA już wydostało się z komórki. Skuteczność tej zaproponowanej nowatorskiej metody została wykazana w testach endolizyn Cpl-1 i Pal. Natomiast, nie mam pewności czy w przypadku testowania bakteriologicznej aktywności wariantów Cpl-1 i Pal, uzyskanych w dalszej części pracy, metoda ta została użyta. Ani w tekście (sekcje Materiały i metody oraz Wyniki), ani w podpisach pod rycinami ilustrującymi otrzymane rezultaty, nie zostało to podkreślone. Prosiłabym o wyjaśnienie czy tak metoda była użyta, a jeśli nie, to dlaczego tej metody nie zastosowano?

Drugim opisanym zadaniem (trzeci punkt Celu pracy) było wskazanie, które regiony w białkach Cpl-1, Pal i PlyC są immunogenne. Do ich wyznaczenia użyto pomysłowo zmodyfikowaną wersję technologii VirScan (nazwaną EndoScan), która wykorzystuje technikę *Phage display*. Ciekawym rezultatem było wykazanie, że różne podjednostki białka PlyC odpowiadają za immunoreaktywność u ludzi (PlyCB) i myszy (PlyCA). Chciałabym się zapytać czy planowana jest kontynuacja tych badań? Rozumiem, że nie mając do dyspozycji modelu mysiego jest to trudniejsze, ale z drugiej strony wszelkie próby obniżenia immunogenności byłyby nakierowane na podjednostkę nie pełniącą funkcji katalitycznych, co mogłoby podwyższać szanse sukcesu. Końcowymi doświadczeniami tego zadania było wskazanie, które aminokwasy białek Cpl-1 i Pal przypuszczalnie wchodzi w interakcje z przeciwciałami IgG, w tym celu zastosowano mutagenizację ukierunkowaną i wspomnianą wyżej EndoScan. W podpisie ryciny, która ilustruje uzyskany wynik wymieniono co prawda PlyC, ale rycina nie zawiera takich rezultatów, a zatem to pewnie pomyłka edytorska.

Kluczowym testem każdego potencjalnego leku jest, obok oceny jego skuteczność, także sprawdzenie jego bezpieczeństwa, tj. ustalenia jak na proponowany lek odpowie układ immunologiczny. W trzeciej części Wyników (pierwszy punkt Celu pracy) mgr Harhala przeprowadził właśnie takie oszacowanie dla endolizyn Pal i Cpl-1: (i) na modelu mysim, tu tylko jeden test toksyczności (wzbudzanie przeciwciał IgE) został wykonany też dla PlyC; (ii) na modelu ludzkim (testy *ex vivo* z użyciem krwi ludzkiej). Uzyskane rezultaty sugerowały brak negatywnego wpływu tych białek. Chciałabym się dowiedzieć jaka była przyczyna **nie** użycia jako modelu, w większości tych testów, PlyC. Dlaczego nie zostało to w tekście uzasadnione?

Ostatnia część wyników dotyczyła prób uzyskania wariantów endolizyn Pal i Cpl-1, które cechowałyby niższą immunogenność niż natywnych białek (4 i 5 punkt Celu pracy). Wyboru odpowiednich aminokwasów do zmian dokonano w oparciu o rezultaty uzyskane w części drugiej. Zaprojektowane i uzyskane w wyniku mutageniezy ukierunkowanej warianty Pal i Cpl-1 testowano następnie w celu ustalenia ich aktywności bakteriologicznej oraz poziomu wzbudzenia produkcji przeciwciał IgG. Większość uzyskanych wariantów nie spełniała wymagania zachowania co najmniej takiej samej aktywności enzymatycznej jak natywne białko, przy obniżeniu immunogenności.

Wyjątkiem był wariant 3 endolizyny Pal (Pal v3), którego aktywność była wyższa, a immunogenność niższa niż natywnej Pal. Tym samym wszystkie zadania Celu pracy zostały zrealizowane.

Dyskusja. Ta część pracy liczy 8 stron, przy czym Autor blisko cztery z nich poświęca omówieniu możliwości zaproponowanej fluorometrycznej metodzie do badania bakteriologicznej aktywności endolizyn, i słusznie podsumowuje, że metoda ta ma ogromny potencjał aplikacyjny. W mojej opinii zabrakło podkreślenia, że użycie tej metody było bardzo istotne w przeprowadzonych badaniach zawartych w rozprawie. I chociaż faktycznie białka Pal i Cpl-1 służyły Autorowi do „ustawienia” tej metody i pokazania jej skuteczności, to najważniejszym zadaniem tej zaproponowanej metody (dla rozprawy), było użycie jej do testów wariantów białek Pal i Cpl-1 o pożądanych właściwościach. Druga część Dyskusji została poświęcona omówieniu właściwości otrzymanych wariantów endolizyn Pal i Cpl-1 i możliwości ich aplikacji. Jestem bardzo ciekawa jak mgr Harhala zinterpretuje uzyskane wyniki (wyższa/niższa immunogenność, wyższa/niższa aktywność enzymatyczna wariantów w stosunku do natywnych białek) wobec wyników analiz krystalograficznych Cpl-1 i Pal?

Z obowiązku recenzenta wymienię kilka dodatkowych dostrzeżonych błędów edytorskie. Szereg z nich jest konsekwencją kopiowania treści z opublikowanych artykułów, w których prezentowane były wyniki uzyskane przez Doktoranta:

- sformułowanie „*in this article*” (np. s. 34, 35), które nie miało prawa pozostać w dysertacji,
- redundancja podrozdziałów w sekcji Materiały i metody – *Ethical statement* (3 i 22),
- redundancja informacji dotyczących użycia *Streptococcus pneumoniae* (1 i 17),
- odniesienia do rycin: Figure 3 (a nie 6) s. 50 czy Figure 7 (a nie 3) s.62, Figure 9 (nie 3) s. 64,
- nie wymieniona Tabela 3 w spisie tabel s.8,
- błędnie podpis segmentów (A i B) na rycinie 17,
- rysunek i jego podpis powinny być skumulowane 1 stronie A4.

Podrozdział „*Determination of immunogenic amino acids in Cpl-1 and Pal enolysins*” powinien być przesunięty tuż przed podrozdział dotyczący prób deimmunizacji tych endolizyn, co ułatwiłoby płynność czytania rozprawy.

Te wyżej wymienione uwagi mają jedynie charakter informacyjny i nie wymagają komentarza Doktoranta.

Uwaga merytoryczna: nie zgadzam się z następującym twierdzeniem Autora, że najpopularniejszym elementem przyłączonym do peptydoglikanu są kwasy tejchojowe; tak ale tylko u bakterii Gram dodatnich. Kwasy tejchojowe są w zasadzie nieobecne u bakterii Gram ujemnych.

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktoranta uważam:

- opracowanie nowatorskiej metody badania aktywności bakteriologicznej endolizyn,
- zidentyfikowanie immunogennych obszarów w endolizynach Pal, Cpl-1 i PlyC,
- pomysłową adaptację metody VirScan do użycia jej w identyfikacji immunogennych epitopów,
- przeprowadzenie analizy oraz identyfikację reszt aminokwasowych w białkach Pal, Cpl-1 biorących udział w oddziaływaniach z przeciwciałami IgG,
- uzyskanie wariantu Pal o potencjale aplikacyjnym w terapii przeciwko patogennym pneumokokom.

Chcę też że podkreślić, że mgr Harhala w bardzo trafny sposób wybrał metody badawcze do swoich badań. a przeprowadzone badania dowodzą bardzo dużych umiejętności Doktorant w poprawnym posługiwaniu się nowoczesną metodologią. Wymienię kilka z nich: klonowanie, nadprodukcja, izolacja i oczyszczanie białek; izolacja RNA z komórek ludzkich i użycie go w analizie transkryptomicznej (mikromacierze), analizy ELISA, badania *in vivo* na modelu mysim ludzkim, fluorometria, *Phage display*. Przypuszczam, że umiejętności techniczne mgr Harhali były ogromnym

wsparciem w badaniach zespołu Pani Profesor Krystyny Dąbrowskiej, bo oprócz trzech wspomnianych, mgr Harhala był współautorem 15 publikacji, które ukazały się w uznanych czasopismach w ciągu ostatnich 9 lat.

Na zakończenie muszę zaznaczyć, że moja ogólna ocena pracy doktorskiej mgr Harhali jest w pełni pozytywna. Niewątpliwie stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Jestem też pod wrażeniem ogromu pracy jaki został wykonany.

Większość moich krytycznych komentarzy dotyczyła organizacji tekstu rozprawy, które zaburzały zrozumienie ciągłości i celowości zdarzeń, oraz kwestii edytorskich. Wymienione uchybienia przytaczam z obowiązku recenzenta, głównie po to żeby zwrócić uwagę Doktoranta jak bardzo takie szczegóły są istotne dla perfekcji całej pracy. Natomiast nie wpłynęły one na ocenę merytoryczną wartości rozprawy, gdyż uwagi te nie podważają uzyskanych wyników i poprawności ich interpretacji. Podsumowując, dysertację mgr Harhali należy uznać za samodzielnie rozwiązany problem badawczy przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganiem stawianym rozprawom doktorskim.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stanowi też dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia przez Doktoranta prac naukowych w zakresie mikrobiologii, biologii molekularnej i immunologii. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN o dopuszczenie magistra Marka Harhali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpis