Prof. dr hab. Teresa Urbanik-Sypniewska
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS

Lublin, dnia 15 czerwca 2016r.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 20-06-2016
L. dz. 265/16

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Man-Kupisińskiej p.t. **„Molekularne podstawy i efekty biologiczne oddziaływań endotoksyn z ludzką fikoliną H i lektyną wiążącą mannan"**

Praca doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Man-Kupisińskiej p.t. **„Molekularne podstawy i efekty biologiczne oddziaływań endotoksyn z ludzką fikoliną H i lektyną wiążącą mannan"** została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Jolanty Łukasiewicz z Zakładu Immunochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN i dotyczy interakcji składników układu dopełniacza z endotoksynami bakterii jelitowych. System dopełniacza pełni kluczową rolę w reakcjach na zakażenia drobnoustrojami oraz procesach chorobowych o podłożu immunologicznym np. toczniu rumieniowatym układowym. Spośród trzech dróg aktywacji dopełniacza droga lektynowa została poznana najpóźniej. Drogę lektynową podobnie jak klasyczną charakteryzuje wspólna właściwość: oddziaływanie składników białkowych ze strukturami węglowodanowymi jest warunkiem zmiany konformacyjnej, w wyniku której dochodzi do aktywacji proteaz serynowych i proteolizy kolejnych białek układu. W surowicy człowieka szlak lektynowy jest inicjowany przez cząsteczki należące do układu PRM (Pathogen Recognition Molecules): lektynę wiążącą mannan (MBL) oraz fikoliny-1, -2 i -3 (H). Ich zadaniem jest rozróżnianie antygenów obcych od własnych. Biologiczne efekty aktywacji dopełniacza mogą być następujące: reakcja zapalna z udziałem anafilatoksyn (C3a, C4a, C5a), fagocytoza z udziałem opsonin (C3b and C4b) i liza komórek patogenów z udziałem kompleksu MAC.

MBL rozpoznaje szeroki zakres struktur węglowodanowych występujących na powierzchni patogenów. Dotychczasowe dane wskazują na stosunkowo małą swoistość rozpoznawania ligandów, którymi są struktury glikolipidów i glikoprotein zawierające terminalne reszty D-mannozy, D-glukozy, N-Acetylo-D-glukozaminy, L-fukozy i acetylowane reszty cukrowe. Do niedawna jako ligandy MBL i fikoliny H znane były lipopolisacharydy, zawierające homopolimery D-mannopiranozy w polisacharydach O.

Podjęte przez Doktorantkę badania mechanizmów molekularnych reakcji inicjowanej przez składniki drogi lektynowej miały na celu wyróżnienia motywów strukturalnych ligandów, niezbędnych do rozpoznania przez lektyny a w następnej kolejności sprawdzenie czy rodzaj związanego ligandu wpływa na właściwości biologiczne kompleksu.

Z kolekcji szczepów o zdefiniowanej strukturze LPS wybrano te z rodzajów *Klebsiella, Hafnia, Proteus*, *Plesiomonas* i przeprowadzono badania przesiewowe, na podstawie których wytypowano preparaty dające najbardziej efektywne reakcje z MBL ludzką i mysimi oraz fikoliną-3.

Analizę strukturalną polimerów i oligomerów węglowodanowych wykonano przy pomocy metod spektrometrii mas w tym sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową i jonizacją typu MALDI i ESI oraz technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Do detekcji oddziaływań międzycząsteczkowych użyto technikę NMR pomiaru różnic w przenoszeniu nasycenia STD-NMR oraz metodę pomiaru rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR), które umożliwiają precyzyjną jakościową i ilościową identyfikację atomów tworzących wiązania wodorowe oddziałujących cząsteczek. Dzięki zastosowaniu mapowania strukturalnego przy pomocy powyższych technik zlokalizowano protony fragmentów endotoksyn, zaangażowane w oddziaływania z MBL i fikoliną H.

Wśród zastosowanych metod część procedur stanowi oryginalne osiągnięcie Doktorantki, które okazało się kluczowe w wyjaśnieniu mechanizmu interakcji fikoliny-3 z jej ligandami. Oryginalna procedura izolacji z osocza z zastosowaniem kilku etapów frakcjonowania w tym oddziaływań hydrofilowych (na kolumnie ZIC-HILIC) i wiązania do ligandu pozwoliła na uzyskanie fikoliny-3, całkowicie pozbawionej MBL oraz fikolin -1 i -2 i oczyszczonej w stopniu nieosiągalnym przy pomocy dotychczas znanych metod.

Podstawą dla zdefiniowania struktury swoiście reagującej z MBL i fikoliną-3 było maksymalne oczyszczenie obu składników badanego układu. W tym celu wykonano pełną analizę strukturalną precyzyjnie rozdzielonych frakcji poli- i oligosacharydów, produktów kontrolowanej degradacji LPS ze szczepów: PCM 1200 *Hafnia alvei, Proteus penneri* 12 i *P. vulgaris* 9/57. Na jej podstawie potwierdzono identyfikację wcześniej znanych struktur oraz dokonano identyfikacji nowych dotychczas nie opisanych struktur O-PS i OS w LPS *P. vulgaris* 9/57 i *P. penneri* 12. Należy zaznaczyć, że większość wyników badań strukturalnych została opublikowana w pracach z udziałem mgr A. Man-Kupisińskiej. Preparat O-PS z LPS *Hafnia alvei* PCM 1200 oczyszczony do stanu homogenności został unieruchomiony na złożu, co

umożliwiło wysoce wydajną i swoistą izolację fikoliny-3 z osocza metodą chromatografii powinowactwa. Uzyskany tą metodą preparat fikoliny-3 miał zdecydowaną przewagę w badaniach oddziaływań metoda SPR, w porównaniu z rekombinowaną fikoliną, która zawiera domieszki buforów. Co więcej, dzięki opracowanej procedurze oczyszczania uzyskano preparat zachowujący proteazy MASP, a przy tym zawierający przeciwciała klasy IgG. Aktywacja dopełniacza mierzona zdolnością kompleksu do rozszczepianiem składnika C3 i C4 była dowodem zdolności tego kompleksu do aktywacji drogi lektynowej i klasycznej. Ta droga funkcjonowania kompleksów składników dopełniacza stanowi nowe odkrycie i jego badania będą kontynuowane.

Oddziaływania hydrofilowe zostały wykorzystane do analizy in situ (za pomocą analizy MS z jonizacją strumieniem elektronów - ESI) heterogenności wyizolowanych preparatów endotoksyn i z powodzeniem użyte do frakcjonowania oligosacharydów rdzenia *Escherichia coli* R1, preparatyki oligosacharydów RU-[Hep]-Kdo spośród glikoform oligocukrów rdzenia oraz mono, di-, tri- i tetrasacharydów zawierających Hep i Kdo z LPS *H. alvei* PCM 1200.

Zidentyfikowano 113 nowych ligandów dla MBL z surowicy ludzkiej. Najwięcej ze szczepów *H. alvei* oraz *K. pneumoniae* a najmniej *P. mirabilis*. Motywami rozpoznawanymi przez ludzką MBL były w większości LPS rdzeniowe heterooligosacharydy o strukturze rdzenia typu *H. alvei*.

W tym miejscu należy podkreślić doskonałą dokumentację wyników, zwłaszcza sposób przedstawiania widm NMR, z przejrzystą identyfikacją poszczególnych sygnałów. Dane te wraz z interpretacją jonów obserwowanych w widmach ESI-MS dobrze się uzupełniają i stanowią czytelny obraz interpretacji wyników.

Jednym z zaskakujących odkryć było stwierdzenie braku udziału Kdo w stereochemii oddziaływań MBL z ligandami oraz reakcje z lektynami heteropolimerów, w których jako reszty terminalne występowały GlcNAc, Glc, Hep w odróżnieniu do wcześniej opisywanych ligandów zawierających połączone ze sobą reszty D-mannozy. Co więcej, kompleksy MBL i LPS *H. alvei* były aktywne jako inicjatory kaskady dopełniacza w drodze lektynowej, przy czym aktywność ligandów posiadających rozpoznawane motywy w oligocukrach rdzenia była porównywalna z tymi, w których te motywy występują w polisacharydzie O. Nasunęło to Doktorantce pytanie o dostępność tych epitopów w komórce bakteryjnej. Przy pomocy metody cytometrii przepływowej ustalono, że zależy ona od fazy wzrostu hodowli. Jednym z najciekawszych ustaleń rozprawy było stwierdzenie największej ilości epitopów w spoczynkowym okresie wzrostu hodowli, w którym znaczna część komórek ma oligosacharydy

rdzenia nie podstawione przez O-PS. Ten fakt może mieć istotne znaczenie w przewidywaniu przebiegu zakażenia i podatności patogenu na dopełniacz.
Na złożoność mechanizmów aktywacji drogi lektynowej wskazywało wystąpienie wyjątkowo silnej aktywacji przez O-PS *P. vulgaris* 9/57 proteazy MASP-1, co sugeruje, że szczególne konfiguracje lektyn i ligandów, mogą mieć znaczenie w patogenności niektórych serotypów bakterii. Z drugiej strony otrzymane wyniki mogą przybliżyć wyjaśnienie mechanizmów rozróżniania szczepów komensalnych i patogenów oportunistycznych, takich jak *H. alvei*.

Wyniki badania zdolności oddziaływania MBL z MASP -1 i -2 z udziałem glikoform LPS oraz poszczególnych klas immunoglobulin otrzymane na podstawie reakcji immunoblotowania wskazywały na występowanie różnych miejsc wiązania Ig i glikoform w cząsteczce MBL i fikoliny. Wykonane dodatkowo testy immunoenzymatyczne nie w każdym przypadku potwierdziły wynik otrzymany metodą Western blot; np. wykryto bardzo słabe oddziaływanie O-PS *H. alvei* 1200 z MBL lub bardzo silną reakcję z LPS szczepu 1192. Doktorantka stwierdza, że ten ostatni test w większym stopniu odzwierciedla naturalną ekspozycję LPS na komórce bakteryjnej. Zależność wyniku od stosowanej metody potwierdza zasadność stosowania różnych technik, co właśnie zostało wykonane przez Doktorantkę. Kolejnym dowodem potwierdzającym wnioski z analizy SPR i STD-NMR była analiza zdolności kompleksów wyselekcjonowanych na podstawie obu powyższych metod do aktywacji drogi lektynowej dopełniacza w testach na odkładanie czynnika C4b i C4c.

Do najbardziej wartościowych osiągnięć ocenianej rozprawy należą:
identyfikacja struktury wariantów LPS eksponowanych na powierzchni patogenów i ustalenie struktury rozpoznawanej przez kompleksy lektyna-MASP oraz udowodnienie skutków tych interakcji w postaci aktywności biologicznych. Opisano różnice w reakcji z ligandami mysich fikolin i mechanizm rozpoznawania podobnych struktur LPS przez mysie lektyny MBL-A i MBL-B, których funkcje w surowicy człowieka pełni pojedyncze białko.
W przypadku fikoliny-3 stwierdzono duży stopień homogenności struktur, do których ulega ona wiązaniu; tak jak w przypadku MBL przebadano ponad sto LPS lecz wykryto tylko cztery do tej pory nie opisane warianty O-PS, obok czterech wcześniej opisanych.

Po zapoznaniu się z niezwykle obszernym materiałem zawartym w ocenianej rozprawie nasuwają się spostrzeżenia, które pozwalam sobie zamieścić jako ciekawe problemy do dyskusji:

- W ocenianej pracy przedmiotem analizy molekularnych oddziaływań endotoksyn z cząsteczkami drogi lektynowej dopełniacza były głównie ligandy węglowodanowe. Czy Doktorantka rozważa możliwość badania interakcji z użyciem wzorcowych ligandów np. wybranych glikoform LPS *H. alvei* PCM 1200 z MBL oraz fikolinami z różnych gatunków zwierząt lub otrzymanymi z surowicy pacjentów z infekcjami spowodowanymi niedoborami składników dopełniacza np. polimorfizmem w genie *MBL2* lub polimorfizmem genów *FCN* dla fikolin-2 i 3. Niedawno ukazała się praca na ten temat w Molecular Immunology podsumowująca wyniki porównania występowania RA (Rheumatoid Arthritis) u ludzi z polimorfizmem w genie *MBL2*.

- Czy złożony charakter oddziaływań ligand-lektyna (wiązania wodorowe, miejsca wiążące jony Ca^{2+}, oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne) ma znaczenie w utrzymaniu stabilności i zdolności koordynacyjnych ich kompleksów w warunkach odbiegających od fizjologicznych np. zaburzeniach homeostazy.

- Czy obecność aminokwasów glicyny, treoniny, alaniny w części rdzeniowej LPS lub szczególnej formy otwartego pierścienia GalNAc w polisacharydzie O ma wpływ na aktywność wiązania ligandów, dający się przewidzieć na podstawie wyników analizy strukturalnej.

- Wizualizacja LPS opisywana na str. 115-116 możliwa była w reakcji z przeciwciałami ale nie metodą srebrową. Można przyjąć wyjaśnienie podane przez Doktorantkę na str. 116. Znalazłam też inne: cząsteczki LPS zawierające niewielką ilość lub nie zawierające reszt kwasów tłuszczowych acylujących lipid A, które mogą powstać np. **podczas izolacji** LPS są wypłukiwane z żelu na etapie utrwalania ale nie podczas transferu na membranę. To wyjaśnienie zaproponowali Fomsgaard, Freundenberg i Galanos, J. Clin. Microbiol. (1990) 28, 2627-2631; czy taka przyczyna mogłaby mieć miejsce w przypadku badań wykonanych przez Doktorantkę.

Uwagi:

1. Opisując słabą reakcję LPS *K. pneumoniae* serotyp O3 (str. 113) zawierający homopolimer mannozy stwierdzono, że reakcja z MBL była bardzo silna natomiast „w przypadku szczepu PCM 57 i PCM 58 również zawierających O-PS w postaci homopolimeru mannozy, obserwowane reakcje były bardzo słabe": nie przedstawiono wyjaśnienia przyczyn takiego wyniku.

2. Str. 119, Ryc.6.6. Lipidy A nie reagowały z mysimi i ludzką MBL; na ryc. **D** widoczny jest słaby prążek w przypadku szczepu 1192 z ludzką MBL, jak można wyjaśnić tę reakcję

3. Str. 223 i 224 „geny wykazują .....% homologię – powinno być podobieństwo:

homologię kwalifikuje się w kategorii jest lub nie ma (wspólnego przodka) a podobieństwo wyraża się w % identyczności (nukleotydów lub aminokwasów).

Wymienione uwagi w najmniejszym stopniu nie wpływają na bardzo wysoką ocenę rozprawy.

Rozprawa jest obszerna liczy 275 stron, podzielona jest na 13 rozdziałów w tym literaturę w ilości 304 pozycje. Układ rozprawy jest przejrzysty a praca jest zredagowana bardzo starannie. Jak już wspomniano większość wyników przedstawionych w ocenianej rozprawie została opublikowana. Doktorantka jest autorem jednej monografii i sześciu publikacji, w dwu z nich jest pierwszym autorem, w takich prestiżowych czasopismach, jak: PLoS One, Carbohydr. Res., Immunobiology, Marine Drugs, J. Am. Soc. Mass Spectrom. Ponadto wyniki badań prezentowała podczas licznych konferencji naukowych, z których dwie prezentacje zostały nagrodzone.

Należy podkreślić, że część środków finansowych wykorzystanych do wykonania badań ocenianej rozprawy pochodziła z projektów Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ oraz Narodowego Centrum Nauki (projekt badawczy Preludium 4).

Przedstawioną do oceny pracę doktorską Pani mgr inż. Aleksandry Man-Kupisińskiej oceniam niezwykle wysoko. Praca wnosi doniosły wkład do dotychczasowej wiedzy o podstawach molekularnych interakcji składników wrodzonej odporności immunologicznej z cząsteczkami na powierzchni komórek bakterii rozpoznawanymi jako obce oraz konsekwencji biologicznych tych oddziaływań. Nowe informacje uzyskane na podstawie wykonanych eksperymentów wnoszą duży ładunek praktyczny np. do możliwości przewidywania przebiegu zakażeń bakteryjnych. Rozprawa świadczy o dużej samodzielności naukowej i umiejętności wykorzystania bardzo różnych technik: immunologicznych i analiz strukturalnych. Na podkreślenie zasługuje opracowanie metody, oczyszczanie fikoliny-3 z surowicy ludzkiej, co z pewnością znajdzie zastosowanie w praktyce.

Na podstawie powyższej oceny stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Man-Kupisińskiej spełnia bez zastrzeżeń wymagania

stawiane pracom doktorskim (zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r., Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy, która spełnia warunki podane w regulaminie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu – uzasadnienie w załączeniu.

Teresa Urbanik-Sypniewska