

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG

Gdańsk, dnia 12.03.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katariny Stojković

pt. „Różnorodność strukturalna glikoform antygenów O *Klebsiella pneumoniae*”

Praca doktorska została wykonana pod opieką promotora dr hab. inż. Jolanty Łukaszewicz oraz promotora pomocniczego dr inż. Marty Kaszowskiej w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Zakładu Immunochemii, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Klebsiella pneumoniae jest Gram-ujemną bakterią należącą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Jest ona częścią mikroflory ust, jelit i skóry człowieka oraz innych ssaków, jak również może występować w wodzie, ściekach, glebie, czy na roślinach. Bakteria ta w sprzyjających warunkach charakteryzuje się dużą zjadliwością, wywołuje szereg groźnych chorób, m.in. infekcje dróg moczowych, zapalenie płuc, posocznice, zakażenia tkanek miękkich, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, ale także bakteriemie, która może rozwinąć się w sepsę. *K. pneumoniae* jest przykładem mikroorganizmu oportunistycznego, czyli powodującego choroby u osobników o obniżonej odporności, spowodowanej przewlekłymi chorobami, skomplikowanymi zabiegami chirurgicznymi, długotrwałą terapią antybiotykową, czy wskutek immunosupresji związanej z zabiegami transplantacyjnymi. Do osób z tzw. grupy ryzyka zalicza się osoby po 65 roku życia oraz niemowlaki, a zwłaszcza wcześniaki.

Bardzo istotnym problemem są zakażenia powodowane przez *K. pneumoniae* w szpitalach. W warunkach szpitalnych bakterie zyskują szansę na swobodne rozprzestrzenianie się wśród pacjentów o obniżonej odporności, ale co gorsze, także na pozyskiwanie genów warunkujących lekooporność (tzw. poziomy transfer materiału genetycznego). Jeśli dojdzie do infekcji z udziałem bakterii lekoopornych na wszystkie dostępne antybiotyki, a organizm sam sobie nie poradzi - chory w zasadzie musi umrzeć...

Dlatego bardzo ważne jest poszukiwanie alternatywnych, w stosunku do antybiotykoterapii, sposobów leczenia, a najlepiej zapobiegania chorobom powodowanym przez bakterie, oczywiście nie tylko lekooporne bakterie. Wydaje się, iż takim sposobem jest stosowanie odpowiednich szczepionek. Do ich produkcji niezbędne są odpowiednie antygeny. W przypadku bakterii ważne są antygeny znajdujące się na powierzchni ściany komórkowej, m.in. antygeny kapsularne (CPS) oraz antygeny O (O-PS).

W opisaną problematykę doskonale wpisuje się praca doktorska mgr Katariny Stojković poświęcona izolacji i analizie strukturalnej antygenów O, pochodzących z różnych szczepów *K. pneumoniae*. Przeprowadzone badania były częścią międzynarodowego projektu „Opracowanie strategii terapeutycznej opartej na biernej immunizacji przeciwciałami monoklonalnymi oraz strategii diagnostycznej skierowanej przeciwko ostrym infekcjom wywoływanym przez *Klebsiella*” realizowanego przez firmy biotechnologiczne z Niemiec i Austrii oraz IBZ w Berlinie i IITD we Wrocławiu. Wyizolowane przez doktorantkę antygeny O były również wykorzystywane do produkcji, a następnie charakterystyki przeciwciał monoklonalnych.

O tym, iż tematyka badań podjęta w dysertacji jest nie tylko aktualna, ale również potrzebna świadczą najnowsze doniesienia prasowe, mianowicie od początku roku 2018 (do połowy lutego) stwierdzono u 27 pacjentów hospitalizowanych w sześciu podmiotach leczniczych województwie pomorskiego obecność szczepu bakterii *K. pneumoniae* wytwarzającego karbapenemazy klasy D, a dokładnie enzym OXA-48, któremu doktorantka poświęca podrozdział 3.2.1.4. rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska licząca 129 stron została podzielona na 11 numerowanych rozdziałów. Układ rozdziałów i ich zawartość są typowe dla tego typu pracy.

Praca rozpoczyna się od zwięzłych i bardzo przystępnie napisanych rozdziałów *Streszczenie* oraz *Summary*, odpowiednio rozdział 1 i 2.

Kolejnym numerowanym rozdziałem jest *Wstęp*, który liczy 25 stron. Nazwa tego rozdziału jest moim zdaniem nieadekwatna do jego zawartości, oczywiście ze względu na jego bardzo dużą objętość. Wydaje się, że lepszym rozwiązaniem byłoby nazwanie tej części np. *Przegląd literaturowy*. Rozdział ten składa się z pięciu części, w których doktorantka kolejno opisuje chorobotwórczość bakterii z rodziny *Klebsiella*, lekooporność *K. pneumoniae*, antygeny powierzchniowe *K. pneumoniae*, wykorzystanie antygenów powierzchniowych *K. pneumoniae* w terapii biernej i czynnej oraz metody wykorzystywane do strukturalnych badań antygenów cukrowych. Pierwsze cztery podrozdziały napisane są bardzo przystępnie i poparte są licznymi aktualnymi odnośnikami literaturowymi. Natomiast pewien niedosyt budzi część dotycząca metod instrumentalnych, która napisana jest na bardzo dużym poziomie ogólności z wykorzystaniem 4 odnośników literaturowych. Zwłaszcza podrozdział 3.5.3 *Spektrometria masowa sprzężona z chromatografią gazową* napisany jest bardzo lakonicznie i z zasadzie zawiera 2-3 zdania dotycząca GC-MS, natomiast pozostały ogólny opis dotyczy analizy cukrowej i metylacyjnej. Należy podkreślić, iż tematyka poruszona we *Wstępie* jest ściśle związana z częścią eksperymentalną rozprawy doktorskiej.

Doktorantka za cel badań postawiła sobie analizę strukturalną szeregu szczepów *K. pneumoniae* z serotypów O1, O2 oraz O3, a także ocenę użyteczności techniki HR-MAS NMR do serotypowania na podstawie analizy powierzchni komórek bakteryjnych oraz niezdegradowanych LPS-ów. Nie nazwałbym celami punktów 1 i 2 (hodowla szczepów, izolowanie i oczyszczanie LPS-ów oraz otrzymywanie O-PS-ów) ponieważ są to działania niezbędne do zrealizowania celów zdefiniowanych w punktach 3-5. Należy jednak mieć świadomość, iż są to etapy najbardziej czasochłonne i pracochłonne. Po otrzymaniu O-PS-ów, dalsza ich analiza strukturalna to już „czysta przyjemność”.

Rozdział *Materiały i metody* napisany jest krótko, ale zawiera praktycznie większość szczegółów dotyczących przeprowadzonych eksperymentów. Może brakuje oddzielnego podrozdziału *Spektrometria mas*, któremu poświęcono trochę uwagi w rozdziale *Wstęp*.

Rozdział *Wyniki* liczy 50 stron i jest najobszerniejszą częścią rozprawy doktorskiej. Można w nim w zasadzie wyróżnić 2 części – badania strukturalne polisacharydów O-swoistych oraz wykorzystanie spektroskopii HR-MAS NMR do serotypowania szczepów *K. pneumoniae*. Doktorantka przeprowadziła hodowlę 15 szczepów bakterii *K. pneumoniae*, które wymienione są w Tabeli 2 rozprawy doktorskiej. Z otrzymanej masy bakteryjnej wyizolowała LPS-y, który następnie poddała oczyszczaniu i hydrolizie w celu odszczepienia lipidów A. Otrzymane po wirowaniu supernatanty, zliofilizowała i frakcjonowała za pomocą chromatografii wykluczania na złożach BioGel P-10 lub HW-40F. Wyizolowane O-PS-y poddała analizie strukturalnej, które obejmowała metody chemiczne (analiza cukrowa, analiza metylacyjna) oraz metody spektroskopowe, głównie NMR.

Przeprowadzone badania strukturalne szczepów z serotypów O1 i O2 potwierdziły doniesienia jednego z partnerów projektu, iż obecność operonu *gmlABC* może odpowiadać za modyfikację strukturalną antygeny O polegającą na podstawieniu końcową α -D-Galp w pozycji 4 reszty $\rightarrow 3$ - α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ w tzw. gal-I, czyli $\rightarrow 3$)- β -D-Galf-(1 $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$. Tak zmodyfikowany polisacharyd został oznaczony symbolem gal-III. Potwierdzono również, iż szczepy, które nie wykazywały obecności operonu *gmlABC* nie syntezowały polisacharydu gal-III.

Doktorantka w swoich badaniach zajęła się również wyjaśnieniem występowania możliwych modyfikacji O-PS-ów wśród szczepów *K. pneumoniae* O3. Na podstawie analizy strukturalnej obejmującej spektroskopię NMR oraz spektrometrię mas (MALDI-TOF MS) stwierdziła, iż:

- szczep 5505 Δ *cps* syntezuje O-PS zbudowany z jednostek powtarzalnych zawierających 5 reszt mannozy; szczep został zaliczony do prototypowego serotypu O3,
- szczep PCM-11 syntezuje O-PS zbudowany z jednostek powtarzalnych zawierających 4 reszty mannozy; serotyp do którego należy ten szczep nazwano O3a,
- szczep Kp81 syntezuje O-PS zbudowany z jednostek powtarzalnych zawierających 3 reszty mannozy; serotyp do którego należy ten szczep nazwano O3b.

Bardzo ciekawym fragmentem rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie HR-MAS NMR do serotypowania szczepów *Klebsiella*. Doktorantka udowodniła, iż możliwe jest to poprzez porównanie widm ^1H lub ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT HR-MAS NMR zarejestrowanych dla LPS-ów z katalogiem widm przygotowanym wcześniej dla wyizolowanych O-PS-ów. Na uwagę zasługuje znaczące skrócenie całej procedury do 1 tygodnia dzięki zastosowaniu mikroekstrakcji LPS, w porównaniu do klasycznej izolacji LPS, a następnie wyodrębnienia O-PS. Niestety, ale to chyba zgodnie z przewidywaniami, nie udało się wykorzystać tej techniki do serotypowania szczepów na podstawie widm zarejestrowanych dla całych komórek bakteryjnych. Wynika to z licznych, dodatkowych sygnałów na widmach, które uniemożliwiają porównanie sygnałów pochodzących od LPS.

Rozdział *Wyniki* zawiera liczne tabele i ryciny, które dokumentują szeroki zakres wykonanych badań, a jednocześnie pozwalają na podążanie tokiem myślenia Doktorantki podczas planowania eksperymentów oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Bardzo ważnym i dobrze napisanym rozdziałem jest *Dyskusja*, w którym Doktorantka uzupełnia swoje wyniki badań o wyniki otrzymane przez partnerów projektu oraz konfrontuje z doniesieniami literaturowymi. Po przeczytaniu tego rozdziału można stwierdzić, iż postawione w rozprawie cele zostały w pełni zrealizowane.

Kolejne rozdziały stanowią zestawienie wykorzystanej literatury i zamieszczonych w pracy tabel i rysunków (rozdziały 9 i 10). Doktorantka zamieściła w pracy 75 rycin i 15 tabel oraz wykorzystała 123 odnośniki literaturowe, co może nie jest liczbą ogromną, ale wydaje się wystarczającą.

Rozprawa zakończona jest rozdziałem 11 - *Dorobek naukowy*, na który składają się 4 publikacje w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, z czego w dwóch Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto Kandydatka jest współautorką 7 doniesień konferencyjnych, jednego zgłoszenia patentowego oraz brała udział w realizacji 3 projektów naukowych. Na uwagę zasługuje również aktywna działalność w samorządzie doktorantów.

Pracę przeczytałem z dużą przyjemnością. Jest napisana logicznie, poprawnym językiem, formatowanie tekstu jest wręcz doskonałe, a także należy pochwalić świetny pomysł z drukiem dwustronnym. Jednak przy taki obszernym opracowaniu trudno jest ustrzec się drobnych pomyłek lub opisując skrótowo pewne treści wywołać zaniepokojenie recenzenta. Poniżej przedstawiam kilka wybranych zagadnień.

- W rozdziałach *Wyniki* i *Dyskusja* brakuje mi formy osobowej. Wszędzie jest napisane otrzymano, wyhodowano, rozdzielono, analizowano itp.. Recenzentowi nie pozostaje nic innego jak założyć, iż wszystkie eksperymenty, a następnie interpretacja wyników zostały przeprowadzone przez Doktorantkę.
- W rozdziale 3.5.2. w podpunkcie „stałe sprzężenia” wspomniane są wzajemne orientacje protonów ekwatorialno-ekwatorialne oraz ekwatorialno-aksjalne. Czy coś wiadomo na temat orientacji aksjalno-aksjalnych? i czy wartości te mogłyby być wykorzystane w tej pracy?
- S.36.l.4 (d) „Analiza strukturalna polisacharydów metodą spektroskopii NMR polega na identyfikacji systemów spinowych, czyli przesunięć chemicznych wszystkich atomów ^1H i ^{13}C ...” Czy to wystarczy?
- S.36.l.9 (d) Skąd pochodzi wyrażenie „anomeria”?
- S.37.l.11 (d) Co oznacza, że eksperyment TOCSY jest analogiczny do COSY?
- S.39.l.4 Czy interpretacja rozdzieleni chromatograficznych rzeczywiście umożliwia ustalenie wiązań glikozydowych? A jeżeli tak to jak?
- S.39.l.9 oraz s.45.l.16 Czy rzeczywiście wykorzystywano „chromatograf gazowo-cieczowy”
- Nie bardzo rozumiem podobieństwa chromatogramów uzyskanych na dwóch różnych złożach [s.48.l.6 (d); Ryc. 16 i 17], a także zawartości poszczególnych frakcji (środek s.

50). Ponadto, wydaje się, że szczep Kp20, który figuruje w podpisie pod Ryc. 17 i 71 nie był przedmiotem badań.

- S.52.I.6 (d) W jaki sposób wykorzystano czasy retencji do zidentyfikowania reszt Galp i Galf podstawionych w pozycjach 3?
- Mam spore wątpliwości co do sposobu opisu reszt cukrowych na podstawie wyników NMR. Przytoczę przykład dotyczący reszty B ze strony 58 (ostatnie 4 linijki). Nie wiadomo, które „elementy strukturalne” reszt cukrowych zostały określone na podstawie podanych informacji, np. skąd nagle pojawiło się przyporządkowanie reszt Gal do szeregu konfiguracyjnego D? o czym mówi podana stała sprzężenia C1-H1? Czy rzeczywiście stała sprzężenia H1-H2 jest „wysoka”, skoro zapewne wynosi ok. 3,5 Hz? Na jakiej podstawie stwierdzono „wysoką” wartość przesunięcia chemicznego atomu węgla C3?
- S.58.I.8 (d) Skąd wiadomo, iż wartość stałej sprzężenia H1-C1 równa 175 Hz świadczy o formie *furano* pierścienia cukrowego reszty Gal? Jak również, dlaczego wartość 167 Hz świadczy o konfiguracji anomerycznej α reszty Gal (s.80.I.5)
- S. 84 W jaki sposób zidentyfikowano α -D-Man?
- Czy *Klebsiella* to gatunek czy rodzina (tytuł podrozdziału 3.1 oraz pierwsze zdanie tego podrozdziału).
- Litery D lub L oznaczające przyporządkowanie do szeregu konfiguracyjnego powinny być pisane dużymi literami rzymskimi o wysokości małych liter (tzw. kapitalikami) (Ryc. 4 i 6). W części eksperymentalnej reguła ta jest przestrzegana.
- Przykładowe korelacje zaznaczone na Ryc. 15. Pomysł doskonały, ale losowy sposób oznaczenia korelacji uniemożliwia zrozumienia zagadnienia osobom niezorientowanym w temacie.
- Tabela 13. Wydaje się, że dla reszty C wartości przesunięć chemicznych atomów 3-6 są nieprawidłowe (takie same jak dla reszty D). W związku z tym odpowiednie wartości w Tabeli 14 też są nieprawidłowe.
- S.39.I.3 oraz I.10 a także bardzo wiele razy w części *Wyniki* - O-metylowych, O-acetylowych – „O” w tego typu określeniach powinno być pisane kursywą.
- S.52.I.11 (d) Rodzaj reszt cukrowych to np. Gal, Man, natomiast *furano* i *pirano* to są formy pierścienia.
- S.52.I.5 (d) oraz s.56.I.6, a także w wielu miejscach *Wyników* pojawiające się określenia „otrzymanych widm masowych”, „wykonano jednowymiarowe widma protonowe” proponowałbym w przyszłości zastąpić słowami „zarejestrowano”, czy „zmierzono”
- Ryc. 32 i 37. W podpisie jest „korelacje pomiędzy protonami a przyłączonymi do nich atomami węgla”.
- S. 86 i 87. Wydaje się, że reszta B jest Man, natomiast Gal w nawiasie to pomyłka.
- Na koniec chciałbym zwrócić uwagę na problem nazewnictwa dotyczącego spektrometrii mas. Doktorantka zamiennie używa określenia spektrometria mas i spektrometria masowa, widmo mas i widmo masowe. Nie tylko moim zdaniem, poprawną formą, najlepiej opisującą technikę, jest spektrometria mas. Jakkolwiek trzeba przyznać, że w części polskojęzycznej literatury oraz w niektórych środowiskach

naukowych używa się określenia spektrometria masowa. I o ile stosowanie tej „drugiej formy” ewentualnie można uznać za dopuszczalne, to już zamienne stosowanie obu nazw nie powinno mieć miejsca.

Wszystkie powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie pomniejszają bardzo dużej wartości poznawczej i potencjalnie aplikacyjnej rozprawy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o strukturach O-PS bakterii *Klebsiella*. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane, sprawnie posługuje się technikami separacyjnymi i spektroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do wyizolowania antygenów O, a następnie określenia ich struktury chemicznej.

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Instytut IITD PAN we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katariny Stojković do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz opublikowanie ich w renomowanych czasopismach z listy JCR wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z. Kozłowski