



Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katariny Stojković
„Różnorodność strukturalna glikoform antygenów O *Klebsiella pneumoniae*”

Praca Pani Katariny Stojković to przykład bardzo solidnej pracy z pogranicza immunologii, biologii strukturalnej i fizykochemii cukrów. Stanowi ona kontynuację badań prowadzonych przez Panią dr hab. inż. Jolantę Łukasiewicz z Zakładu Immunochemii IITD PAN i dotyczy charakterystyki strukturalnej glikokoform antygenów O, niezwykle zjadliwej bakterii *Klebsiella pneumoniae* odpowiedzialnej za śmierć ogromnej liczby ludzi na całym świecie. Jednym z ważnych problemów dotyczących tej tematyki jest próba częściowej odpowiedzi na pytanie czy proponowana immunoterpia skierowana przeciwko kilku antygenom O jest skuteczniejsza w porównaniu do terapii skierowanej przeciwko blisko setce antygenów K. Praca doktorska Pani mgr Katariny Stojković jest ważnym krokiem w odpowiedzi na to pytanie.

W swoich badaniach Doktorantka przeprowadziła analizę strukturalną zarówno prototypowych jak i wybranych szczepów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*. Kryterium wyboru była częstość występowania serotypów wśród szczepów klinicznych oraz zaobserwowana różnorodność w obrębie genów odpowiedzialnych za biosyntezę O-PS w grupie szczepów o tym samym serotypie. W celu wyjaśnienia wpływu operonu *gmlABC* na zróżnicowania strukturalne w obrębie serotypu O2, analizy prowadzono dla szczepów Kp26 i PCM-27 reprezentujących odpowiednio warianty *gml*⁻ i *gml*⁺ serotypu O2. Podobnie w celu zróżnicowania strukturalnego w obrębie serotypu O1 przeprowadzono także badania dla szczepów Kp4 oraz Kp24 będących reprezentantami *gml*⁻ i *gml*⁺ tego serotypu. Doktorantka podjęła się również wyjaśnienia różnic obserwowanych dla genów regulujących biosyntezę O-PS o serotypie O3 z użyciem szczepów Kp81, PCM-11 oraz 550Δ*cps* będących reprezentantami serotypów O3b, O3a i O3.

W pierwszej kolejności, w celu nagromadzenia masy bakteryjnej potrzebnej do izolacji LPS *K. pneumoniae* Doktorantka przeprowadziła standardowe izolacje bakteryjne. Oczyszczone LPS poddawano łagodnej kwaśnej hydrolizie czego produktem była

mieszania rozpuszczalnych w wodzie poli- i oligosacharydów oraz nierozpuszczalnego lipidu A. Liofilizowaną mieszaninę rozdzielano metodą filtracji żelowej otrzymując sześć lub siedem frakcji, zależnie od użytego złoża. Zebrane frakcje poddano wstępnej analizie MS i NMR w celu ustalenia ich składu. Nie jest dla mnie jasne co konkretnie było kryterium podziału frakcji I (Ryc. 16 i Ryc. 17) na frakcje a, b i c skoro sygnał I na Rycinie 16 jest całkiem symetryczny, a przykładowo sygnał III i IV już nie. W kolejnym kroku Doktorantka przeprowadziła analizę cukrową frakcji O-PS poddanej modyfikacji do lotnych octanów alditoli w celu identyfikacji poszczególnych składników cukrowych. By ustalić rodzaj reszt cukrowych (piranoza lub furanoza) oraz zidentyfikować miejsca podstawienia składników cukrowych przeprowadzono analizę metylacyjną. W kolejnych etapach frakcje poddano analizie strukturalnej z użyciem spektroskopii NMR w celu ustalenia kompletnej struktury powtarzających się podjednostek cukrowych i wyjaśnienia charakteru modyfikacji cukrowej. W tym celu Autorka wykonała szereg eksperymentów NMR, głównie dwuwymiarowych, pozwalających na przypisanie sygnałów poprzez zmienną ilość wiązań chemicznych, a także przestrzeń. Głównymi parametrami pozwalającymi na wyciągnięcie wniosków strukturalnych poza zróżnicowaną gamę eksperymentów korelacyjnych było przesunięcie chemiczne protonów i węgla ^{13}C a także stałe sprzężeń. Ta szeroka analiza, zarówno klasyczna jak i z wykorzystaniem techniki NMR pozwoliła Autorce na stwierdzenie, a w zasadzie potwierdzenie tego, że to galaktan-I (gal-I) jest składnikiem polisacharydu O-swoistego szczepu Kp26 (O2 *gml*-). Na szczególną uwagę zasługuje analiza strukturalna polisacharydu szczepu PCM-27 (O2 *gml*+), w którym galaktan-I (gal-I) podstawiony jest terminalną galaktopiranozą (α -D-Galp). Tak zmodyfikowaną i powtarzającą się jednostkę galaktanu-I autorzy odkrycia (w tym Doktorantka) nazwali galaktanem III. Uważam, że ta analiza strukturalna i odkrycie nowej jednostki polisacharydu O-swoistego jest jednym z najważniejszych dokonań mgr Stojković. Odkrycie to zostało opublikowane w 2017 roku w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* a Doktorantka jest pierwszym autorem opublikowanego doniesienia. Odkrycie to pozwoliło na wyciągnięcie wniosków na temat roli operonu *gmlABC* w modyfikacji O-PS serotypu O2. Autorka pokazała mianowicie, że obecność tego operonu w szczepie PCM-27 i mutancie komplementacyjnym Kp26/pKp100 odpowiada za modyfikację gal-I do gal-III. Podobna analiza strukturalna polisacharydów O-swoistych szczepów *K. pneumoniae* serotypu O1, Kp4 (*gml*-) i Kp24(*gml*+) pozwoliła Doktorantce na podobne stwierdzenie, że obecność operonu *gmlABC* prowadzi do modyfikacji gal-I do gal-III i nie ma wpływu na jednostkę galaktanu II (gal-II) zidentyfikowaną również w O-PS tych szczepów.

W kolejnym etapie prac Doktorantka przeprowadziła analizę strukturalną polisacharydów O-swoistych szczepów Kp81, PMC-11 oraz 5505 Δ cps serotypu O3. Wcześniejsze analizy serologiczne z użyciem mysiej surowicy skierowanej na szczep PCM-11 wskazywały bowiem na możliwość zróżnicowania strukturalnego w obrębie tego serotypu. Zastosowanie podobnych eksperymentów NMR wspomaganych analizą strukturalną z wykorzystaniem spektrometrii masowej MALDI-TOF pozwoliło Autorce na stwierdzenie, że podjednostki O-PS serotypu O3b, O3a i O3 zbudowane są kolejno z trzech, czterech i pięciu reszt mannoz. Doktorantka nie przedstawiła jednak w tym wypadku analizy cukrowej i metylacyjnej pozwalającej na stwierdzenie rodzaju reszt cukrowych. Z tego powodu prosiłbym o krótkie przedstawienie tej analizy podczas obrony. Mam tu też pytanie - niezwiązane bezpośrednio z analizą polisacharydów szczepów O3 a dotyczące rodzajów informacji strukturalnych odnośnie polisacharydów jakie można otrzymać przy zastosowaniu technik spektrometrii mas. Mam wrażenie, że Autorka ograniczyła się jedynie do pomiaru różnicy mas konkludując tym samym na temat ilości powtarzających się jednostek.

W mojej ocenie niezwykle ciekawe podejście badawcze, którego podjęła się Doktorantka, stanowiła ocena przydatności spektroskopii HR-MAS NMR do serotypowania szczepów *K. pneumoniae*. Metoda ta znajduje zastosowanie w badaniu zarówno amfifilowych cząsteczek jak i ciał stałych, półstałych, półpłynnych itp. W metodzie tej próbkę umieszcza się pod „magicznym” kątem (stąd „high resolution magic angle spinning” NMR) 54,7° względem pola magnetycznego co skutkuje uśrednieniem i wyzerowaniem anizotropii przesunięć chemicznych oraz sprzężeń dipolowych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia stosunku sygnału do szumu typowych dla układów niejednorodnych. Możliwość zastosowania tej metody do analizy struktur polisacharydów bezpośrednio na powierzchni komórek bakteryjnych lub niezdegradowanych preparatów LPS, stanowiłoby uproszczenie w ustalaniu serotypów bakteryjnych. Jak się okazało zastosowanie całych komórek serotypów O1, O2, O2ac, O3, O4, O5 i O12 nie pozwoliło na jednoznaczne typowanie ze względu na pojawiające się dodatkowe sygnały w obrębie protonów anomerycznych cukrów. Dopiero zastosowanie przez Autorkę niezdegradowanych preparatów LPS i porównanie z biblioteką widm oczyszczonych O-PS pozwoliło na poprawne serotypowanie większości zastosowanych prób. Mimo, że ta część pracy Doktorantki należy według mnie do najciekawszych brak jest tu jednak wyczerpującej dyskusji otrzymanych wyników oraz jednoznacznego stwierdzenia, jak zaimplementowane podejście do serotypowania jest lepsze lub pewniejsze w porównaniu do innych metod. Tu prosiłbym Doktorantkę o przedyskutowanie tego zagadnienia i próbę porównania tego podejścia z obecnie stosowanymi metodami. Komentarza wymaga również obserwacja dokonana przez Autorkę dotycząca serotypowania szczepu Kp76.

Zastosowanie wyżej wspomnianej techniki NMR pozwoliło Doktorantce trafnie określić serotyp jako O1 *gml*- co zostało potwierdzone przez inne badania wykonane przez firmę, która dostarczyła owy szczep. Jednakże widmo korelacyjne ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT HR-MAS NMR nie ujawniło obecności reszt charakterystycznych dla galaktanu I (Ryc. 75) mimo, że został on wcześniej zidentyfikowany jako składnik oligosacharydu serotypu O1 *gml*-. Pytanie dlaczego?

Praca doktorska Pani mgr Katariny Stojković poprzedzona jest 25 stronicowym omówieniem literatury, który bardzo dobrze wprowadza czytelnika w część badawczą rozprawy. Cytowana literatura choć nieponumerowana – co nie stanowiło problemu dla recenzenta – to 123 pozycje opublikowane głównie po 2000 roku. Wstęp rozprawy napisany jest w sposób zwarty i kompetentny. Poza charakterystyką chorobotwórczą bakterii z rodziny Klebsiella i opisem ich lekooporności Doktorantka bardzo zgrabnie przeszła przez opis antygenów powierzchniowych ze szczególnym akcentem skierowanym na ich strukturę i biosyntezę LPS. Pewien niedosyt informacji można odczuć czytając rozdział dotyczący wykorzystania antygenów powierzchniowych *K. pneumoniae* w terapii biernej i czynnej. Wart podkreślenia jest bardzo dobrze przygotowany i opisany rozdział poświęcony metodom instrumentalnym wykorzystywanym w badaniach strukturalnych polisacharydów. Uważam, że ten rozdział był konieczny by czytelnicy rozprawy mogli zagłębić się w detale technik MS i NMR stosowanych w badaniach Autorki. W tej części pracy dobrze byłoby umieścić również krótki opis tego, jakie informacje można uzyskać z klasycznych metod takich jak analiza cukrowa czy metylacyjna.

Dyskusja wyników w postaci 11-stronicowego rozdziału jest przygotowana bardzo starannie i co ważne nie jest powieleniem wyników ale ich autentyczną dyskusją. Największym mankamentem tej części pracy jest szeroki opis wyników niezwiązanych bezpośrednio z wynikami części eksperymentalnej. Dowiadujemy się tu o ważnych faktach, które doprowadziły do przeprowadzenia opisywanych badań. Myślę, że część tych informacji mogłaby z powodzeniem być zawarta we wstępie rozprawy a obecna forma zakłóca chronologię i utrudnia samą dyskusję. Przykładem tego niech będzie opis wyników immunoblotingu, którego nie mogłem znaleźć ani w części wynikowej ani we wstępie pracy. Pomijając te wady, dyskusja napisana jest bardzo zgrabnie i co ważne w analityczny sposób. To samo podejście zastosowała Autorka w ostatnim rozdziale „Wnioski”. Schematyczny (dosłownie) opis ułatwia czytelnikowi zrozumienie najważniejszych osiągnięć zawartych w rozprawie.

Pracę wieńczy prezentacja dorobku naukowego Doktorantki, w którym zaprezentowała ona listę publikacji, najważniejsze doniesienie konferencyjne, zgłoszenie patentowe,

nagrody oraz projekty, w których uczestniczyła podczas realizacji pracy doktorskiej. Warto wspomnieć, że recenzowana praca stanowiła część europejskiego projektu Klebiscure realizowanego w konsorcjum złożonym z dwóch firm biotechnologicznych – Arsanis Biosciences GmbH z Wiednia, GATC Biotech z Konstancji, Instytutu Biologii Zakażeń im. Maxa Plancka w Berlinie i oczywiście IITD PAN. Głównym celem tego sporego projektu było opracowanie strategii terapeutycznej opartej na biernej immunizacji przeciwciałami monoklonalnymi oraz strategii diagnostycznej skierowanej przeciwko ostrym infekcjom wywołanym przez *Klebsiella*. Choćby z tego tytułu praca Doktorantki nie była podobna do typowych prac doktorskich. Autorka w dość dynamiczny sposób opisuje zwroty w badaniach konsorcjum oraz to jak wyniki pozostałych członków grupy wpływały na jej badania. Chciałbym tu jednoznacznie podkreślić, że mimo, iż praca była wykonywana w dużym zespole, w żaden sposób nie ujmuje to samodzielności Autorki i samym walorom naukowym pracy. Powiem więcej, praca badawcza w tak sporym, międzynarodowym zespole musiała stanowić spore wyzwanie dla Autorki co z pewnością, poza naukowymi aspektami pracy, pozwoliło Doktorantce szlifować zasady dynamicznej współpracy naukowej.

Poza wymienionymi mankamentami i brakami nie mam poważnych zarzutów do recenzowanej pracy. Doktorantka mogła w sposób bardziej chronologiczny podejść do badań konsorcjum i część istotnych informacji zaszerwować we wstępie pracy unikając tym samym, nieco oderwanych od samej rozprawy, opisów tych wyników w innych rozdziałach. Praca napisana jest poprawnym językiem i czyta się ją naprawdę bardzo dobrze. Doktorantka nie uniknęła pewnych drobnych błędów związanych z małymi czy dużymi literami, przecinkami itp. Brak jest również rozwinięcia pewnych skrótów w ich wykazie, a samo rozwinięcie w języku polskim bywa miejscami trochę niezrozumiałe lub niestylistyczne. W rozdziale „Materiały i metody” brak jest opisu (choćby krótkiego) separacji z użyciem GC-MS. Z mojej własnej ciekawości, chciałbym się również dowiedzieć, jaka jest ilość jednostek galaktanów (indeks n) w analizowanych strukturalnie polisacharydach i czy ta ilość jest w jakiś sposób skorelowana z poszczególnymi serotypami. W opisie analizy korelacyjnej widm heterojądrowych reszt cukrowych polisacharydu O-swoistego PCM-27 O2 *gml*⁺ i dalszych opisach Autorka wprowadziła obok symbolu reszt A i B również symbol C, który myli się czytelnikom z opisywanymi atomami węgla C w poszczególnych resztach. Chciałbym się również dowiedzieć skąd wiadomo, że na Ryc. 45 sygnał zaznaczony gwiazdką jest faktycznie zanieczyszczeniem? W Rozdziale 6.4 brak jest opisu analizy cukrowej i metylacyjnej. Skąd wiadomo, że składnikiem polisacharydu jest mannoza?

Reasumując, mimo pewnych niedociągnięć, o których wspomniałem powyżej, stwierdzam, że przyszło mi recenzować bardzo ciekawą pracę, której wyniki są wartościowe pod względem technicznym i naukowym. Praca pani mgr inż. Stojković to przykład bardzo dobrze zrealizowanego projektu badawczego i spełnia ona w pełni warunki zarówno ustawowe jak i zwyczajowe jakie stawia się rozprawom doktorskim. Dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z tym, że większość wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach oraz stała się podstawą wniosku patentowego wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku
Artur Krężel



Wrocław, 26-03-2018