



UNIwersytet w Białystoku
Instytut Biologii
Zakład Mikrobiologii
15-245 Białystok, ul. Konstantego Ciołkowskiego 1J
Tel. + 48 857 388 410, Fax +48 857 388 414

Dr hab. Izabela Święcicka, prof. UwB
E-mail: izabelas@uwb.edu.pl

Białystok, 15.09.2016

Ocena rozprawy doktorskiej pt.

„Spore based vaccine against pseudomembranous colitis”

Autor rozprawy: **mgr Alessandro Negri**

Promotor rozprawy: **Prof. dr hab. Michał Obuchowski**

Promotor pomocniczy: **dr hab. Krzysztof Hinc**

Znaczenie tematyki badawczej podjętej przez Doktoranta

Rozprawa doktorska mgr. Alessandro Negriego, przygotowana w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, przedstawia próbę opracowania szczepionki przeciwko *Clostridium difficile*, czynnika etiologicznego rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego. Jest to praca interdyscyplinarna, w której Doktorant umiejętnie łączy wiedzę oraz techniki badawcze z zakresu mikrobiologii, immunologii i biotechnologii, co czyni doktorat interesującym dziełem naukowym.

Ocena problemu badawczego, doboru celów badań oraz metod badawczych

Antybiotyki stanowią znakomity oręż w walce z bakteriami, jednakże ich zbyt częste lub nieumiejętne stosowanie, doprowadza do zaburzenia równowagi fizjologicznej człowieka. Problemem związanym z antybiotykoterapią jest selekcja i namnażanie bakterii opornych na dany antybiotyk. Jednym z takich drobnoustrojów jest *C. difficile*, którego nadmierna obecność i synteza toksyn doprowadza do stanu zapalnego, zwanego rzekomobłoniastym zapaleniem jelita grubego. Zwiększone stosowanie antybiotyków przyczynia się do wzrostu liczby przypadków tego typu zachorowań, coraz częściej kończących się zejściem śmiertelnym, co stanowi

ogólnoświatowy problem medyczny i ekonomiczny. Z tego względu próba opracowania przez Doktoranta szczepionki przeciwko *C. difficile* jest cenna i ma duży potencjał aplikacyjny.

Problem badawczy został przedstawiony na podstawie bogatego i dobrze dobranego piśmiennictwa. Autor dogłębnie opisał biologię *C. difficile*, czynniki związane z patogenezą tej bakterii oraz podstawy biotechnologii szczepionek, w tym szczepionek rekombinowanych, wykazując się szeroką wiedzą w zakresie podjętych badań. Trafnie też zobrazował trudności związane z diagnostyką oraz leczeniem zakażeń powodowanych przez *C. difficile*. Z punktu widzenia podjętej tematyki badawczej, cenne jest zapoznanie czytelnika z mechanizmami odpowiedzi immunologicznej w infekcjach układu pokarmowego oraz wskazanie elementów komórki *C. difficile*, które stanowiły w badaniach własnych punkt wyjścia do tworzenia szczepionki. W przygotowaniu szczepionki bazowano na przetrwalnikach (endosporach) *Bacillus subtilis*. We *Wstępie* Autor przedstawia opis tej bakterii, genetyczne podstawy syntezy endospor oraz ich przydatność jako systemu prezentowania antygeny. Moja uwaga dotyczy tytułu dysertacji. Uważam, że fakt bazowania w badaniach własnych na endosporach *B. subtilis* winien mieć odzwierciedlenie w tytule. Po drugie, jest generalnie przyjęte, iż *Wstęp* artykułów naukowych, projektów badawczych, jak i doktoratów, kończy prezentacja celu(ów) badań. W recenzowanej pracy Doktorant zamiast celów zaprezentował *Plan pracy*. Poszczególne punkty planu w istocie odpowiadają celom pracy. Niemniej, w przyszłych pracach naukowych, sugeruję wyraźne wyróżnienie celów badawczych w formie akapitu kończącego *Wstęp* lub nawet jako samodzielnego rozdziału.

Plan pracy jest ambitny. Założono opracowanie wektorów z determinantami komponentów rzęsek *C. difficile*, ulegających ekspresji w rekombinowanych szczepach *B. subtilis*, co skutkuje wytwarzaniem endospor z osłonami połączonymi z białkiem FliD o właściwościach antygenowych. Plan został zrealizowany dzięki zastosowaniu różnorodnych, często wysoce zaawansowanych, metod biologii molekularnej oraz przeprowadzeniu prób biologicznych w modelu zwierzęcym. Schemat przeprowadzonych eksperymentów jest logiczny i spójny, a metody badawcze zostały dobrane prawidłowo.

Analiza osiągniętych wyników

W pierwszym etapie dokonano konstrukcji wektorów ekspresyjnych z determinantami FliD *C. difficile* oraz osłon endospor *B. subtilis* w celu syntezy tych białek w *E. coli*. Następnie stworzono wektory integracyjne do produkcji białek fuzyjnych FliD z poszczególnymi białkami otoczki endospor *B. subtilis*. Część wektorów integracyjnych zawierała też determinanty

wybranych interleukin. Należy podkreślić, iż konstrukty genowe zostały wykonane z „dużą finezją”, właściwie dobrano wektory, potwierdzono obecność wklonowanych genów w konstrukcie i uzyskano wysoką nadekspresję genów. Jeszcze większym sukcesem było włączenie zintegrowanych genów kodujących białka osłonki endospory oraz rzęski *C. difficile* do chromosomu szczepu *B. subtilis* 168. Obecność genów fuzyjnych w transformantach potwierdzono w reakcji PCR, a zdolność do syntezy białka FliD podczas wegetatywnego wzrostu oraz obecność tego białka na przetrwalnikach wykazano za pomocą Western blotting. Jestem pełna uznania za umiejętności manipulacji genetycznych i uzyskiwania konstruktów genetycznych oraz transformantów o pożądanym właściwościach. Niemniej chciałabym zapytać o wydajność produkcji białek fuzyjnych. W rozdziale 6.6 Doktorant podaje procent białek fuzyjnych syntetyzowanych przez transformanty *cot-fliD* w stosunku do całkowitej ilości białek osłon endospor. Ilość białek fuzyjnych różniła się nawet trzykrotnie, np. CotG-FliD *versus* CotB-FliD. Czy w szczepach dzikich *B. subtilis* jest też tak duża różnica w syntezie poszczególnych białek osłon przetrwalników?

W kolejnych analizach Doktorant potwierdził występowanie białka FliD na powierzchni endospor, stwierdzając różne natężenie fluorescencji dla poszczególnych białek fuzyjnych. Bazując na badaniach ilościowych można byłoby oczekiwać, iż najsilniejsza fluorescencja będzie notowana dla transformantów BAN03, syntetyzujących białko fuzyjne CotG-FliD. Tymczasem to transformanty BAN05 (CotB-linker-FliD) charakteryzowały się najwyższą fluorescencją. Autor ten wynik tłumaczy w *Dyskusji* różną reaktywnością białek fuzyjnych z przeciwciałami. Czy rzeczywiście jest to jedyne wyjaśnienie? W mojej ocenie nie bez znaczenia najwyższą fluorescencję stwierdzono dla endospor prezentujących CotB z C-terminalnym motywem GGGEAAAKGGG o właściwościach stabilizujących białka fuzyjne. Być może inne białka fuzyjne pozbawione motywu stabilizującego, ulegają szybkiej degradacji lub dochodzi do blokady epitopu.

Główną ideą doktoratu było opracowanie szczepionki przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelita grubego powodowanego przez *C. difficile*. Z tego względu równocześnie z tworzeniem konstruktów genetycznych, testowano odpowiedź immunologiczną przeciwko białku FliD u zwierząt laboratoryjnych. Ten etap badań wykonano z dużą skrupulatnością, prowadząc immunizację myszy w różnych wariantach i szacując syntezę różnych wskaźników odpowiedzi immunologicznej. Wszystkie wyniki analizowano statystycznie w odniesieniu do hodowli kontrolnych. Początkowo oszacowano poziom cytokin u immunizowanych myszy i stwierdzono podwyższoną syntezę interferonu gamma w przypadku immunizacji zwierząt doustnie i donosowo transformantami BAN05 (CotB-linker-FliD), BAN06 (CgeA-FliD),

BAN03 (CotG-FliD) i BAN07 (CotG-FliD-IL-1 β). Wykazano też podniesienie poziomu interleukiny 6, 10 i 17A. Następnie szacowano poziom przeciwciał, stwierdzając jedynie podwyższony poziom IgG w przypadku immunizacji endosporami prezentującymi nierekombinowane białka FliD zaadsorbowane na powierzchni endospor. Pomimo braku odpowiedzi immunologicznej dla wszystkich testowanych parametrów, uważam, że Doktorant otrzymał interesujące wyniki, które pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, iż w przypadku szczepionek rekombinowanych FliD w organizmie dochodzi do odpowiedzi komórkowej a nie humoralnej.

Wyniki zostały krytycznie przedyskutowane w *Dyskusji* w oparciu o bogate piśmiennictwo. Ze znajomością rzeczy uzasadniono wybór białka FliD jako antygeny, co było oryginalnym pomysłem Doktoranta. Należy podkreślić, iż zastosowanie białka FliD jako antygeny w szczepionkach przeciwko *C. difficile*, niosło za sobą ryzyko pewnych niepowodzeń. Rzeczywiście Autor nie wykazał indukcji silnej odpowiedzi immunologicznej w odniesieniu do wszystkich testowanych parametrów. Niemniej przeprowadzone badania należy uznać za ważne i przybliżające do opracowania szczepionki przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelit wywoływanemu przez *C. difficile*. Niewątpliwie z punktu widzenia nabytych umiejętności badawczych, wszystkie eksperymenty przeprowadzone przez Doktoranta są bardzo cenne.

Ocena prezentacji rozprawy

Układ rozprawy doktorskiej jest generalnie zgodny z zasadami przyjętymi dla prac naukowych. Pewnym odstępstwem jest wcześniej wspomniane w niniejszej recenzji zastąpienie celów badań planem pracy. Dodatkowo nie wyodrębniono wniosków, niemniej można je wyczytać w treści rozdziałów *Wyniki* i *Dyskusja*. Zazwyczaj w rozprawach doktorskich umieszcza się spis rycin, tabel oraz wykaz stosowanych skrótów, co ułatwia czytającemu orientowanie się w treści dysertacji. W recenzowanej pracy zrezygnowano z tych podrozdziałów. Poza powyższymi uwagami, należy podkreślić, iż praca została przygotowana starannie pod względem edytorskim. *Wstęp* dysertacji zaopatrzone w czytelne ryciny. Pomimo, że w treści *Wstępu* nie znajdują odnośników do rycin, to ułatwiają one zrozumienie prezentowanych treści. Odczynniki chemiczne, zestawy komercyjne oraz materiały użyte do badań, zostały opisane ze szczegółami. Jednakże zwracam uwagę Autorowi, iż obecnie odczynniki Fermentas są firmowane przez Thermo Scientific (m.in. strony 39 i 50). Otrzymane rezultaty zostały przedstawione w sposób klarowny i czytelny, a na szczególną uwagę zasługuje bardzo staranne przygotowanie rycin przedstawiających uzyskane konstrukty genowe. Dysertacja jest dobrze przygotowana pod względem estetycznym i jest napisana poprawnym językiem.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr. Alessandro Negriego wyróżnia się wartością naukową podjętej tematyki, dobrze zaplanowanymi i realizowanymi badaniami oraz interesującymi wynikami. Recenzowana rozprawa odpowiada spełnia wymagania *Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym*, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Z tego względu wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, o dopuszczenie mgr. Alessandro Negriego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Nigriche