



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Miecznikowa 1, 02-945 Warszawa



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 02. 07. 2015.

Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Ocena pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Stasiłojć pt. „Szczepionka przeciwko *Helicobacter pylori* oparta o przetrwalniki bakterii *Bacillus subtilis*”

Praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Stasiłojć w całości została zrealizowana w pracowniach Zakładu Bakteriologii Molekularnej w Katedrze Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UGd i GUM, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Michała Obuchowskiego. W Zakładzie Bakteriologii Molekularnej od lat pod kierunkiem Pana Profesora są prowadzone badania nad wykorzystaniem przetrwalników szczepu *Bacillus subtilis* jako szczepionki najnowszej generacji. Dlatego też kolejne projekty badawcze realizowane w Zakładzie to prace wykazujące możliwość wykorzystanie rekombinowanych przetrwalników *B. subtilis* jako nośnika antygenów w projektowanych szczepionkach doustnych. Pani mgr Stasiłojć jako doktorantka od początku studiów doktoranckich bierze czynny więc udział jako wykonawca w tych projektach badawczych, jest też kierownikiem i głównym wykonawcą grantu MNiSW w ramach badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

Poddana ocenie rozprawa doktorska jest więc ściśle związana z badaniami realizowanymi w Zespole badawczym profesora Obuchowskiego i dotyczy konstrukcji wektorów bakteryjnych na bazie *B. subtilis* zdolnych do prezentacji heterologicznych białek na powierzchni przetrwalników w fuzji z białkiem płaszcza oraz oceny zdolności do immunizacji myszy przy udziale tych zmodyfikowanych przetrwalników. Najistotniejszym jednak celem badawczym rozprawy doktorskiej była ocena odpowiedzi immunologicznej konstrukcji zawierającej znane i opisane w literaturze antygeny UreA i UreB pochodzące z *Helicobacter acinonichis*. Użycie tych antygenów w uzyskaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko *H. pylori* było

koniecznością ze względu na ochronę patentową UreA i UreB pochodzących od *H. pylori*. Uzyskanie zaplanowanych konstrukcji pozwoliło więc na ich zastosowanie jako dawcy antygeny podczas immunizacji myszy. Optymalizacja procesu immunizacji wymagało jednak całego szeregu bardzo pracochłonnych i trudnych ze względu na stosowany materiał badawczy eksperymentów, w tym także wyboru odpowiedniego adiuwantu, który byłby w stanie przesunąć w przypadku *H. pylori* odpowiedź immunologiczną w kierunku odpowiedzi typu Th1. Zwykle w przypadku immunizacji szczepionkami opartymi o DNA przeciwko tej bakterii stosowano z powodzeniem cytokinę IL-2, przez co uzyskiwano stymulację odpowiedzi humoralnej oraz komórkowej. Wielkim więc sukcesem można określić wyniki eksperymentów doktorantki, które wykazały, iż IL-2 jest obiecującym adiuwantem dla skonstruowanej szczepionki przeciwko *H. pylori*. Jednak ze względu na możliwość występowania negatywnych skutków zastosowania IL-2 przetestowano także całą serię znanych i stosowanych ostatnio w wakcynologii adiuwantów. Zastosowany jako adiuwant wodorotlenek glinu przyczyniał się do silnej polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi Th1/Th17. Myszy immunizowano z powodzeniem rekombinowanymi przetrwalnikami *B. subtilis* prezentującymi antygen UreB. z zastosowaniem wodorotlenku glinu oraz przetrwalnikami prezentującymi IL-2 w roli adjuwantów. Zaobserwowana polaryzacja odpowiedzi immunologicznej w doświadczeniach z wykorzystaniem związków aluminium jako adjuwantów oraz prezentacją podjednostki UreA w fuzji z białkiem CotZ wydaje się być obiecująca w świetle ostatnich badań nad odpowiedzią immunologiczną na zakażenie *H. pylori*. Ponadto wielce istotnym aspektem aplikacyjnym tej pracy jest także ocena sposobu podawania projektowanej szczepionki. W tym celu porównano dwa sposoby podania potencjalnej szczepionki: dożołądkowo i donosowo. Główną zaletą immunizacji donosowej jest to, że wymaga ona mniejszej dawki przetrwalników. Doktorantka przeprowadziła także doświadczenia oceniające skuteczność badanej szczepionki. Bardzo pomysłowy był eksperyment mający na celu ocenę efektywności fagocytozy bakterii *H. pylori* przez aktywowane mysie makrofagi linii J774. Makrofagi były aktywowane poprzez dodanie supernatantów uzyskanych z hodowli stymulowanych antygenem splenocytów pozyskanych z myszy immunizowanych drogą dożołądkową. Do aktywowanych makrofagów dodawano następnie zawiesinę bakterii *H. pylori* i oceniano efektywność fagocytozy. Tu jednak warto byłoby sprawdzić jak reagują w

tym układzie linie makrofagów rzeczywistych, albowiem linia makrofagopodobnych komórek linii J774 to komórki często używane w tego typu eksperymentach, ale w praktyce daleko odbiegające właściwościami od makrofagów rzeczywistych, izolowanych chociażby ze szpiku. Doktorantka przy użyciu linii J774 jednoznacznie wykazała, że badane supernatanty, użyte w wysokim stężeniu, silnie aktywują mysie makrofagi, obniżając jednocześnie ich żywotność. Szczególnie nasilony efekt zaobserwowano w przypadku supernatantów z nad stymulowanych splenocytów myszy immunizowanych mieszaniną przetrwalników szczepów. Podsumowując te badania, należy uznać, iż wniosek Doktorantki mówiący o tym, że uzyskane w tej pracy wyniki pokazują wyraźnie, iż przetrwalniki bakterii *B. subtilis* są obiecującymi nośnikami antygenów bakteryjnych i mogą służyć jako efektywna szczepionka podawana doustnie lub donosowo jest w pełni uprawniony, jednakże tylko i wyłącznie w przypadku myszy.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, t.j. w skład jej wchodzi kolejno: streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja i spis cytowanej literatury. Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona obszernym wstępem, który został opracowany na podstawie bogatego piśmiennictwa. Bardzo obszerne w pracy są też części: metodyczna oraz wynikowa, co wynika między innymi z faktu, iż dla rozwiązania problemów z konieczności zastosowano szereg wypróbowanych i znanych metod z zakresu biologii molekularnej i immunologii. Dane eksperymentalne udokumentowane są za pomocą 19 rycin. Otrzymane wyniki wnikliwie omówiono w dyskusji. Spis literatury jest także obszerny, obejmuje 245 pozycji. Oceniana rozprawa doktorska nie zawiera błędów merytorycznych. Jej ocena wydaje się nie być sprawą trudną, skoro część wcześniej uzyskanych przez doktorantkę wyników weszła w skład prac oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, takich jak PLoS One, Mol. Biotechnol. Czy Microb. Cell Fact.. Doktorantka jest też współautorem 2 patentów, zarówno krajowym jak i międzynarodowym. Wyniki badań były też przedstawiane na 8 krajowych i międzynarodowych zjazdach naukowych, w których doktorantka brała czynny udział.

Zaprojektowanie eksperymentów i uzyskanie w wyniku ich realizacji tak wielu wartościowych wyników na pewno świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki. Wykonanie większości eksperymentów wymagało stworzenia wielu układów badawczych oraz dobrego przygotowania w zakresie mikrobiologii i immunologii. Część eksperymentalna rozprawy pozwoliła na weryfikację wcześniej zakładanych

hipotez badawczych. Do największych osiągnięć pracy, o dużym znaczeniu aplikacyjnym w zakresie opracowania szczepionki na bazie przetrwalników *B. subtilis* należy zaliczyć udaną próbę zastosowania uniwersalnej konstrukcji prezentującej wszystkie elementy niezbędne do wywołania odpowiedzi immunologicznej. Wykrycie metody, która pozwala na stworzenie skutecznej szczepionki przeciwko groźnej bakterii patogennej otwiera nowe możliwości badawcze i wyznacza nowe kierunki badań. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest też świetnie przeprowadzona dyskusja wyników, podczas której autorka na podstawie uzyskanych wyników sugeruje dobrze podparte pozycjami literatury wnioski prowadzące do wyjaśnienia nowych danych dotyczących mechanizmów działania szczepionek najnowszej generacji. Czytanie pracy, mimo wysokiego poziomu trudności ze względu na trudne immunologiczne specjalistyczne zagadnienia i dużą zawartość informacji, a także często stosowane skróty, staje się przyjemnością, szczególnie wtedy, gdy przedstawiane są kolejne możliwości zastosowania skonstruowanego szczepu. Umiejętny opis wielu skomplikowanych procedur, a także proste i logiczne wyjaśnienia, oczywiście w miarę możliwości stosowanych skrótów i procedur, także przyczyniają się do pozytywnej oceny przedstawionej pracy doktorskiej.

Biorąc powyższe pod uwagę, uważam że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Stasiłój spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę także o stosowne wyróżnienie tej bardzo cennej i ważnej pod kątem aplikacyjnym dysertacji.

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego
prof. dr hab. Jacek Bielecki