



UNIERSYTET GDAŃSKI

Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii



80-822 Gdańsk, ul. Kładki 24, tel: (+4858) 523 63 20; (+4858) 523 63 21; fax: (+4858) 523 64 30  
www.biotech.ug.gda.pl

Dziekanat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 8 09 2015 v.

L.dz. nr 56 / 2015



Prof. UG dr hab. Sylwia Jafra  
Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii UG i GUMed  
Ul. Kładki 24  
80-822 Gdańsk

Gdańsk, 07. 09. 2015

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Stasiłojć, pt.:**  
**„Szczepionka przeciwko *Helicobacter pylori* oparta o przetrwalniki bakterii *Bacillus subtilis*”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Stasiłojć jest oryginalnym opracowaniem, którego przedmiotem była konstrukcja narzędzi pozwalających na uzyskiwanie białek heterologicznych na powierzchni przetrwalników bakterii *Bacillus subtilis* oraz weryfikacja odpowiedzi immunologicznej myszy na rekombinowane przetrwalniki prezentujące modelowe antygeny UreA i UreB *Helicobacter pylori*.

Bakterie *Helicobacter pylori* są uznanym czynnikiem sprawczym zmian patologicznych u zainfekowanych ludzi, prowadzącym do takich schorzeń jak wrzody żołądka i dwunastnicy, a także złośliwych nowotworów tych narządów. Uważa się, że infekcje *H. pylori* są jednymi z najczęstszych infekcji bakteryjnych na świecie, jednocześnie pomimo powszechności występowania, tylko u około 10% nosicieli obecność tych bakterii powoduje zmiany chorobowe. Terapie stosowane obecnie przeciwko infekcjom *H. pylori*, oparte o antybiotyki, są skuteczne, jednak także kosztowne, mogą powodować efekty uboczne, a przebyta infekcja nie uodparnia organizmu na ponowne zakażenia. Szacuje się, że w krajach rozwijających się nawet 80-90% populacji może być zakażone tymi bakteriami, dlatego też, ważne wydaje się poszukiwanie nowych alternatywnych dla antybiotyków, metod zapobiegania i zwalczania infekcji *H. pylori*. Wśród innowacyjnych metod terapeutycznych, szczepionki wziewne i doustne oparte o swoiste antygeny prezentowane na przetrwalnikach bakterii niepatogennych posiadają takie zalety, jak np. łatwość podania i wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej w miejscu docelowym (w tym wypadku układ trawienny).

*Bacillus subtilis* są powszechnie występującymi w środowisku naturalnym bakteriami, zasiedlającymi ryzosferę i powierzchnię roślin, a jako organizmy modelowe, od wielu lat są przedmiotem licznych badań, zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym. Szczepy *B. subtilis* znalazły zastosowanie w produkcji żywności probiotycznej (japońskie natto), pozyskiwaniu enzymów proteolitycznych czy biologicznej ochronie roślin przed patogenami. W ostatnich latach szczególne zainteresowanie wzbudzają przetrwalniki (spory) *B. subtilis*, zarówno jako czynniki probiotyczne stymulujące układ immunologiczny, a także jako „nośniki” enzymów wykorzystywanych w przemyśle czy też „nośniki” potencjalnych antygenów do tworzenia nowoczesnych szczepionek.

Zespół prof. Michała Obuchowskiego z Zakładu Bakteriologii Molekularnej MWB UG i GUMed od lat prowadzi badania przyczyniające się do poznania molekularnych mechanizmów sporulacji *B. subtilis*, a także badania nad wykorzystaniem przetrwalników tych bakterii jako nośników białek heterologicznych, w tym nośników antygenów w potencjalnych szczepionkach. Dlatego też, badania prowadzone przez mgr Małgorzatę Stasiłojć, będące przedmiotem tej rozprawy doktorskiej, przyczyniają się do poszerzenia wiedzy dotyczącej tworzenia nowoczesnych szczepionek przeciwko patogenom ludzi.

Badania mgr Małgorzaty Stasiłojć mają charakter badań ukierunkowanych z potencjałem aplikacyjnym. Doktorantka podjęła się konstrukcji wektorów umożliwiających prezentowanie heterologicznych białek na powierzchni przetrwalników *B. subtilis*, co stanowi istotny wkład w rozwój nowych narzędzi biotechnologii. Warto podkreślić, że skonstruowane przez Doktorantkę wektory zostały objęte zgłoszeniem patentowym krajowym i międzynarodowym.

Natomiast, uzyskane przez Doktorantkę, w dalszej części pracy, wyniki badań odpowiedzi immunologicznej myszy traktowanych przetrwalnikami prezentującymi wybrane antygeny bakterii *H. pylori*, stanowią ważny etap projektowania innowacyjnych szczepionek przeciwko groźnemu patogenowi człowieka. Do immunizacji myszy, mgr Stasiłojć wykorzystywała spory szczepów *B. subtilis* prezentujące antygeny UraA i UreB z *Helicobacter acinonychis*, wykazujące odpowiednio 97% i 99% identyczności sekwencji aminokwasowej z analogicznymi białkami *H. pylori*. Ze względu na ochronę patentową użycia antygenów UreA i UreB *H. pylori*, był to zabieg bardzo przemyślany. W toku badań Doktorantka przetestowała 4 różne adjuwanty potencjalnie przesuważające odpowiedź immunologiczną na zakażenia *H. pylori* w kierunku odpowiedzi komórkowej - Th1. Zastosowanie przetrwalników rekombinowanego szczepu, niosących na powierzchni płaszcza cytokinę IL-2 wraz z przetrwalnikami prezentującymi antygen UreB na powierzchni płaszcza oraz gen *ureB* ulegający ekspresji w trakcie wzrostu wegetatywnego powodowało przesunięcie odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi komórkowej. Adjuwant ten okazał się skuteczny w modulacji odpowiedzi w pożądanym kierunku. Cytokina IL-2 wykazuje aktywność biologiczną, a jej niekontrolowane podanie może prowadzić do efektów ubocznych, ale jak pokazują wyniki badań mgr Stasiłojć, wykorzystanie rekombinowanych przetrwalników niosących na powierzchni IL-2 umożliwia oszacowanie bezpiecznej dawki tej cytokiny podawanej wraz ze szczepionką.



Ze względu na efekty uboczne zastosowania IL-2, w roli adjuwantów Doktorantka testowała także chitosan, saponiny i wodorotlenek glinu. Badania z wykorzystaniem chitosanu zakończyły się niepowodzeniem (prawdopodobnie w wyniku użycia innej niż wcześniej stosowano serii pożywki), a użycie saponin nie przyniosło oczekiwanych efektów. Natomiast zastosowanie jako adjuwantu wodorotlenku glinu (jedyne adjuwant dopuszczony do stosowania u ludzi) powodowało polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1/Th17. Co ciekawe, w ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej istotną rolę odgrywał również sposób podania rekombinowanych przetrwalników. I tak, podanie drogą dożołądkową przetrwalników prezentujących odpowiednie antygeny *H. pylori* wraz z adjuwantami (przetrwalniki prezentujące IL-2 i z wodorotlenkiem glinu) wzbudza odpowiedź immunologiczną spolaryzowaną w kierunku Th1/Th17, natomiast podanie przetrwalników drogą donosową wzbudza mieszaną odpowiedź immunologiczną Th1/Th2/Th17 (podwyższony poziom IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 oraz IL-17).

Szczególnie interesujące są wyniki, które Doktorantka uzyskała w doświadczeniach z użyciem antygeny UreA. Wykorzystanie do immunizacji myszy rekombinowanych przetrwalników niosących antygen UreA w fuzji z białkiem CotZ, tworzącym najbardziej zewnętrzną część przetrwalnika, tzw. skorupę, powodowało wzbudzenie mieszanej odpowiedzi immunologicznej typu Th1/Th17, bez stosowania adjuwantu. Jest to osiągnięcie obiecujące w świetle wyników badań innych grup badawczych pokazujących, że zakażenie *H. pylori* prowadzi do aktywacji odpowiedzi typu Th1 i Th17. Jednocześnie, inne badania wskazują, że indukcja odpowiedzi Th1 i Th17 jest wystarczająca by zapewnić myszom ochronę przed infekcją.

Kolejnym interesującym aspektem badań mgr Staisłójc była ocena skuteczności działania rekombinowanych przetrwalników w teście z wykorzystaniem aktywowanych mysich makrofagów linii J774. Test ten miał służyć jako alternatywa doświadczeń typu *challenge*. Mysie makrofagi były aktywowane z wykorzystaniem supernatantów z hodowli stymulowanych antygenem splenocytów myszy immunizowanych drogą dożołądkową. Do tak przygotowanych makrofagów dodawano zawiesiny bakterii *H. pylori* i oceniano efektywność fagocytozy. Doktorantka wykazała brak różnic w wydajności fagocytozy pomiędzy aktywowanymi i nieaktywowanymi makrofagami. Natomiast zaobserwowała istotne różnice w żywotności makrofagów traktowanych różnymi supernatantami. Skłoniło to Doktorantkę do zbadania poziomu czynnika TNF- $\alpha$ , wydzielanego przez aktywowane makrofagi, i będącego markerem ich aktywacji. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wysokie stężenie użytych supernatantów silnie aktywuje mysie makrofagi, jednocześnie obniżając ich żywotność. Najbardziej istotne zatem, w toku dalszej pracy, wydaje się znalezienie takich warunków immunizacji, pozwalających na wydajną aktywację makrofagów i jednocześnie zapewniających odpowiednią ich żywotność.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pozwalają stwierdzić, że podane drogą dożołądkową rekombinowane przetrwalniki *B. subtilis* niosące antygeny *H. pylori* mogą stanowić skuteczną ścieżkę zwalczania zakażeń w warunkach *in vivo*. Jak sama Doktorantka stwierdza, niezbędne do tego są

doświadczenia typu *challenge*, w których immunizowane zwierzęta zakażane są patogenem i badane pod kątem odporności na infekcję.

Powyższe wyniki Doktorantka uzyskała w wyniku starannie zaplanowanych i przeprowadzonych doświadczeń wykorzystując metody immunologii, biochemii i biologii molekularnej.

W formalnej ocenie rozprawy doktorskiej stwierdzam, że ma ona układ przyjęty dla tego typu opracowań doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Praca liczy 94 strony maszynopisu, zawiera 19 rycin oraz 245 pozycji literatury.

Szczegółowo, praca składa się ze Streszczenia, Wstępu, Celu pracy, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji oraz spisu literatury. Poniżej krótko omówię każde z nich.

**Streszczenie** Rozdział ten przedstawia przedmiot badań, omawia pokrótce uzyskane wyniki, które następnie podsumowuje.

**Wstęp.** Rozdział ten stanowi wprowadzenie do problematyki pracy. Autorka w pierwszym podrozdziale przedstawia bakterię *H. pylori*, historie jej odkrycia, epidemiologię i patogenezę. Następnie Doktorantka szczegółowo przedstawia proces kolonizacji żołądka przez *H. pylori*, a także skupia się na najbardziej istotnych czynnikach wirulencji aktywnych w tym procesie. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawia metody diagnostyczne zakażeń *H. pylori*, prezentuje możliwości leczenia infekcji oraz krótko opisuje odpowiedź immunologiczną organizmu na infekcję tymi bakteriami. Podrozdział omawiający odpowiedź immunologiczną jest dość skomplikowanie napisany, co prawdopodobnie związane jest z różnorodnością wyników, często przeciwstawnych, uzyskiwanych przez badaczy z różnych grup. W dalszych częściach rozdziału Wstęp, Doktorantka opisuje bakterie *B. subtilis*, cykl życiowy tych bakterii, budowę i właściwości przetrwalników (spor) oraz ich wykorzystanie jako nośników białek heterologicznych. W ostatniej części opisuje adjuwanty wykorzystywane do pobudzania odpowiedzi immunologicznej.

W części dotyczącej bakterii *B. subtilis*, Doktorantka używa określenia „bakterie probiotyczne”, jednak nie uściśla czy wszystkie szczepy *B. subtilis* są zaliczane do organizmów probiotycznych? Zatem czy wybór szczepu wykorzystywanego do prezentowania antygenów na powierzchni przetrwalników jako szczepionki, ma znaczenie?

**Materiały i Metody.** Rozdziały te obejmują odpowiednio zestawienie materiałów wykorzystywanych podczas przeprowadzania eksperymentów oraz opis procedur doświadczalnych. Oba rozdziały są napisane starannie; opisy metod przedstawione są w sposób zrozumiały i bardzo szczegółowy, umożliwiając powtórzenie przeprowadzonych doświadczeń, jednak kontekst zastosowania danej metody nie zawsze jest jasny.

**Wyniki.** Rozdział ‘Wyniki’ został przez Autorkę pogrupowany w podrozdziały przedstawiające uzyskane rezultaty. Mgr Stasiłojć kolejno stawia problemy badawcze i szczegółowo wyjaśnia uzyskane wyniki. Jednak nie zawsze jasno wy tłumaczona jest zastosowana procedura badawcza lub istota

szczepionek opartych o rekombinowane przetrwalniki *B. subtilis*. Co więcej, prowadzone badania doprowadziły do stworzenia nowych narzędzi biologii molekularnej (wektorów) o dużym potencjale aplikacyjnym. Pani mgr Małgorzata Stasiłojć wykazała się umiejętnym planowaniem eksperymentów, zdolnością wykorzystania wielu technik badawczych oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, w związku z czym, zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani magister Małgorzaty Stasiłojć do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w artykułach o zasięgu międzynarodowym, a utworzone wektory objęte zgłoszeniem patentowym, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie prezentowanej rozprawy doktorskiej.

