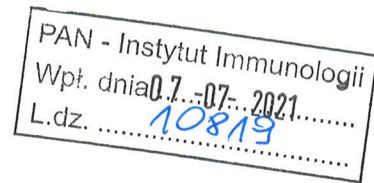




WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki



Łódź, 4 lipca 2021 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Ewy Krzyżewskiej**

pt. „Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella*”

Rozprawa doktorska mgr Ewy Krzyżewskiej została wykonana w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, pod kierunkiem promotora dr hab. Jacka Rybki, prof. PAN. Celem badań doktorantki była analiza rozkładu długości części O-swoistej LPS *Salmonella* na powierzchni bakterii i jego znaczenia w unikaniu działania dopełniacza w surowicy ludzkiej oraz ocena wpływu długości tego fragmentu LPS na patogenność bakterii w testach *in vitro* i *in vivo*. Jak podano we Wprowadzeniu, badania podjęte w doktoracie stanowią kontynuację wcześniejszych prac prowadzonych we współpracy z zespołem naukowym prof. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Bakterie z rodzaju *Salmonella* są często izolowanym patogenem przenoszonym drogą fekalno-oralną. Głównymi źródłami zakażeń tymi pałeczkami są skażona woda lub żywność, w tym mięso drobiu, trzody chlewnej i bydła, a także jaja i produkty mleczne. Częstość infekcji tymi bakteriami jest bardzo duża, o czym można się przekonać studiując raporty urzędów i agencji, zajmujących się monitorowaniem, zapobieganiem i kontrolą chorób zakaźnych. Pałeczki *Salmonella* tzw. szczepy tyfoidalne wywołują dur brzuszny (*Salmonella* Typhi) oraz dury rzekome (*Salmonella* Paratyphi), a nietyfoidalne są przyczyną tzw. salmonelloz i zatruc żołądkowo-jelitowych. Odnotowuje się także zakażenia pozajelitowe oraz posocznice. Oba typy szczepów charakteryzują się podobnymi czynnikami wirulencji warunkującymi przebieg zakażenia. Do głównych czynników patogenności *Salmonella*

zaliczamy fimbrie i afimbriowe adhezyny, system sekrecji typu III, białka błony zewnętrznej i lipopolisacharyd (LPS) stanowiący podczas infekcji endotoksynę. Z drugiej strony makroorganizmy dysponują szeregiem mechanizmów obronnych, chroniących i zapobiegających kolonizacji i rozprzestrzenianiu się patogenów, w tym pałeczek *Salmonella*. Do nich zaliczamy działanie układu dopełniacza, który po aktywacji odgrywa ważną rolę w systemie immunologicznym, w tym przyczynia się do eliminacji bakterii, głównie Gram-ujemnych, powodując ich lizę w następstwie działania MAC (Membrane Attack Complex), którego działanie prowadzi do powstania porów w błonach tych drobnoustrojów. Trzeba jednak dodać, iż bakterie na drodze ewolucji wykształciły mechanizmy obronne, chroniące je przed działaniem dopełniacza. Zaliczamy do nich m.in. wytwarzanie hydrofilowych otoczek, czy też wydłużanie części O-swoistej LPS, co zapewnia im ważną cechę, określaną jako niewrażliwość na działanie surowicy, związaną przede wszystkim z ochroną przed działaniem litycznym MAC. Kompleks C5b-9 dopełniacza jest przez bakterie o takiej budowie deponowany na ich hydrofilowej, powierzchniowej osłonie, która w takich przypadkach oddziela go od części hydrofobowej błon, uniemożliwiając lizę komórek. U bakterii z rodzaju *Salmonella* występują potencjalnie trzy rodzaje LPS o różnej długości polisacharydu O-swoistego – LPS o niskiej masie cząsteczkowej z maksymalnie liczbą podjednostek O-swoistych do 15, LPS określane jako długi, z liczbą podjednostek O-swoistych do 16 do 35 oraz LPS bardzo długi zawierający ponad 100 takich podjednostek w antygenie O. Pałeczki *Salmonella* mogą zmieniać powierzchnię swoich komórek modulując budowę części O-swoistej, syntetyzując LPS o różnej długości antygeny O, tym samym przeciwdziałając litycznemu działaniu układu dopełniacza. Praca doktorska mgr Ewy Krzyżewskiej jest poświęcona temu zagadnieniu.

Jej celem było:

- 1) Określenie roli długości antygeny O *Salmonella* w oddziaływaniu z normalną surowicą ludzką (NSL) i ocena wpływu długości części O swoistej LPS na patogenność bakterii w badaniach *in vitro* i *in vivo*.
- 2) Określenie roli części O-swoistej LPS w kształtowaniu proteomu błony zewnętrznej pałeczek *Salmonella*.

Aby zrealizować pierwszy cel pracy uzyskano mutanty *Salmonella* Enteritidis o zróżnicowanej długości antygeny O LPS oraz opracowano metodę pomiaru tej długości w różnych typach LPS. Mutanty te posłużyły do badań patogenności bakterii, przez ustalenie stopnia pochłaniania pałeczek *Salmonella* przez komórki eukariotyczne, a także ich działanie na larwy *Galleria mellonella*. Aby zrealizować drugi cel pracy, zbadano proteom błony

zewnętrznej *Salmonella* Enteritidis o zróżnicowanej długości części O-swoistej LPS oraz ten proteom u bakterii poddanych działaniu normalnej surowicy ludzkiej.

Oceniana rozprawa doktorska mgr E. Krzyżewskiej ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich i składa się z następujących rozdziałów Wprowadzenia, Wstępu, Celu badań, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków i Literatury. Rozdziały te uzupełniają Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów oraz Spisy rycin i tabel, a także Wykaz dorobku naukowego doktorantki.

W obszernym Wstępie Autorka na początku scharakteryzowała rodzaj *Salmonella*, w tym podstawy klasyfikacji i nomenklatury tych bakterii. Omówiła zagadnienia związane z chorobotwórczością tych pałeczek. Dalej w pracy przedstawiła czynniki chorobotwórczości i mechanizmy patogenezы zakażeń tymi bakteriami. W oddzielnym obszernym rozdziale dokonała przeglądu informacji na temat lipopolisacharydu *Salmonella*, jego struktury i biosyntezy, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów genetycznych kontroli długości wytwarzanych podjednostek O-swoistych. Kolejne podrozdziały Wstępu poświęcone są układowi dopełniacza, drogom jego aktywacji oraz sposobom bakterii unikania jego działania w kontakcie z surowicą ludzką lub pochodzenia zwierzęcego.

Przegląd informacji zaprezentowanych we Wstępie oraz ich ocena świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań doświadczalnych. Wykazała się dobrą znajomością literatury, przedstawiając kompleksowo obiekt badań – pałeczki *Salmonella* oraz układ dopełniacza i jego znaczenie w działaniach obronnych układu immunologicznego podczas infekcji oraz możliwości modulacji budowy LPS bakterii w odpowiedzi na antybakteryjne działanie surowicy.

W badaniach wykorzystano szczepy *Salmonella* pochodzące z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów IITD PAN we Wrocławiu. Do pasażowania bakterii w surowicy ludzkiej wykorzystano szczep *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* PCM 2511 (serogrupa O48, z kwasem N-acetylo-neuraminowym [NeuAc] w strukturze LPS). Do konstrukcji mutantów o różnej długości części O-swoistej LPS wykorzystano szczep *S. enterica* subsp. *enterica* Enteritidis PCM 2817, gdyż wykorzystanie w tym celu pierwszego z wymienionych szczepów nie powiodło się. Do konstrukcji mutantów o zmienionym składzie białek błony zewnętrznej zastosowano szczep *S. enterica* subsp. *enterica* Typhimurium PCM 2255.

Zwraca uwagę bogata paleta zastosowanych metod badawczych, w tym wykorzystanie systemu hiper-rekombinacji λ Red stosowanego do insercji lub delecji określonych genów. W pracy opracowano też metodę pomiaru długości części O-swoistej LPS, która została wykorzystana do oceny wielkości antygeny O w otrzymanych mutantach *Salmonella*. Metodę

tę oparto na pomiarze ilościowym proporcji składników części O-swoistej LPS tych pałeczek tj. ramnozy i tywelozy do kwasu 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowego (Kdo) i D-glicero-D-manno-heptozy (Hep). W analizie długości polisacharydu O-swoistego po działaniu surowicy oznaczano też zawartość NeuAc. Dodatkowo sprawdzano też zawartość kwasu N-acetylmuraminowego w bakteriach, aby ustalić, czy skrócenie części O-swoistej LPS w części plastycznej ściany komórkowej bakterii wpływa na ilość peptydoglikanu w jej części sztywniej. Oceniono też możliwy wpływ długości części O-swoistej LPS w interakcjach bakterii z dopełniaczem, przez określenie poziomu przeżywalności w surowicy ludzkiej uzyskanych mutantów, a także określenie poziomu aktywacji układu dopełniacza przez komórki bakterii oraz wyizolowane rodzaje LPS. Podobnie postąpiono, analizując wiązanie składnika C3 dopełniacza. W badaniach *in vitro* możliwego wpływu długości antygeny O LPS na patogenność *Salmonella* wykorzystano trzy linie komórkowe tj. linię komórek dendrytycznych JAWS II, linię makrofagową RAW 264.7 oraz Caco2 ludzkiego gruczołka okrężnicy. Sprawdzone zdolność pochłaniania pałeczek *Salmonella* wybarwionych SYTO 9 przez ww. komórki eukariotyczne. Do badań *in vivo* wykorzystano larwy barciaka większego *Galleria mellonella*, którym wstrzykiwano do hemocelu zawiesinę komórek badanych mutantów. Sprawdzone też potencjalny wpływ długości części O-swoistej LPS na proteom błony zewnętrznej pałeczek *Salmonella*. W tym celu z mutantów *S. Enteritidis* PCM2817 wyizolowano białka błony zewnętrznej i zidentyfikowano je wykorzystując technikę spektrometrii, po wyznakowaniu białek znacznikami izobarycznymi TMTTM. Zbadano też, jak pasażowanie bakterii *S. diarizonae* PCM 2511 w surowicy ludzkiej wpływa na proteom błony zewnętrznej. Ponieważ nie udało się uzyskać mutantów o zmienionym składzie białek w stosunku do szczepu *S. diarizonae* PCM 2511, zastąpiono w tej części badań ten szczep szczepem *S. Typhimurium* PCM 2255. Uzyskano mutantą pozbawionego białka OmpD tych bakterii, aby sprawdzić na ile brak tego białka w komórkach wpływa na ich przeżywalność w surowicy ludzkiej.

Pragnę zwrócić uwagę na wykorzystanie w pracy doktorskiej przez mgr E. Krzyżewską różnorodnych metod analitycznych, genetycznych i biologicznych. Potwierdza to dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki do podjęcia badań doświadczalnych. Właściwe wykorzystanie bogatego zestawu technik i metod badawczych pozwoliło mgr E. Krzyżewskiej uzyskać cenne i znaczące wyniki, które zostały starannie opracowane i przedstawione przejrzysto w oddzielnym rozdziale dysertacji, a zaprezentowana ich dokumentacja w formie rycin, zdjęć i tabel, nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka zrealizowała podstawowe cele pracy.

Do najważniejszych osiągnięć tej pracy zaliczyć należy:

- 1) Wykazanie, iż pasażowanie bakterii w 50% NSL prowadzi do wzrostu przeżywalności *S. diarizonae* PCM 2511 w tym środowisku, ale nie pozwoliło na otrzymanie wariantu szczepu z charakterystycznym typem LPS, tj. taką jego odmianą, która wyraźnie różniłaby się rozkładem części O-swoistej polisacharydu o różnej długości, z bardzo długimi, długimi czy krótszymi łańcuchami PS na powierzchni komórek. Pasażowanie doprowadziło do zmian w proteomie bakterii tego szczepu.
- 2) Opracowanie oryginalnej metody szacowania długości części O-swoistej LPS *Salmonella* z wykorzystaniem techniki GLC-MS, co zostało wykorzystane do ustalania rozkładu LPS o różnej długości antygen O na powierzchni komórek.
- 3) Uzyskanie panelu zdefiniowanych chromosomalnych mutantów bakterii *Salmonella* ze skróconą długością części O-swoistej. Mutanty te zostały wykorzystane w badaniach wrażliwości bakterii na bójcze działanie dopełniacza i stopnia penetracji komórek eukariotycznych przez bakterie i ich patogenności wobec larw *Galleria mellonella*.
- 4) Dzięki badaniom mutantów o różnej długości części O-swoistej LPS wykazano, iż L-OAg (LPS z długim łańcuchem O-swoistym) odgrywa kluczową rolę w ochronie bakterii przed lityczną aktywnością dopełniacza, a skracanie antygenu O zwiększa stopień pochłaniania pałeczek *Salmonella* przez linię komórkową mysich makrofagów. W badaniach *in vivo* z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella* potwierdzono znaczenie długich i bardzo długich łańcuchów O-swoistych dla wirulencji bakterii.
- 5) Istotnym osiągnięciem pracy jest też wykazanie, iż skracanie części O-swoistej LPS moduluje profil białek mutantów *S. Enteritidis* PCM 2817.

Dyskusja własnych wyników badań mgr E. Krzyżewskiej na tle danych z literatury zasługuje na wysoką ocenę. Jest to bardzo dobrze opracowana część rozprawy doktorskiej. Wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i jej umiejętności analizy dużej liczby danych. Zestawienie literatury w liczbie 238 pozycji obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie.

Nie mam uwag do zastosowanych metod badań, Autorka, jak wspomniałem wyżej, wykorzystwała najnowsze techniki właściwe do zrealizowania postawionych zadań badawczych. Nie mam też zastrzeżeń do uzyskanych wyników, otrzymane dane znacząco wzbogacają naszą wiedzę o znaczeniu części O-swoistej LPS *Salmonella*, w szczególności jej odmian o różnej długości polisacharydu.

Potknięcia stylistyczne zaznaczyłem w pracy i przekazałem doktorantce. Poniżej uwagi i zapytanie do Doktorantki.

1. Na rycinie 5 w lipidzie A *Salmonella* zaznaczono obecność 6 kwasów tłuszczowych, choć dane literaturowe wskazują, iż bakterie te wytwarzają tzw. heptacyl lipid A. Czy w LPS *Salmonella* są obecne 3 reszty Kdo, na co wskazuje też ta rycina. Rozumiem, że jest to schemat obrazujący układ poszczególnych regionów LPS, bez uwzględnienia szczegółów struktury.
2. Str. 71. Rozdział zatytułowano „Przygotowanie linii komórkowych”. Ja uważam, że jest to opis właściwego badania pochłaniania bakterii przez komórki eukariotyczne zastosowanych linii.
3. Autorka rozprawy kończy ją zdaniem „Uzyskane wyniki dostarczając cennych informacji zrodziły także wiele kolejnych pytań, na które odpowiedzi dostarczyć muszą przyszłe badania”. Czy można dowiedzieć się coś na temat tych pytań i badań ?

Mgr E. Krzyżewska jest współautorką 9 publikacji, w tym 3 przeglądowych. Ma udział w realizacji 3 projektów badawczych. Odbyla 2 staże naukowe, w tym jeden w ośrodku zagranicznym.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Evy Krzyżewskiej pt. „Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella*” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uważam, iż recenzowana praca jest pracą wyróżniającą się i godną nagrody.

A. N. W. i. h. k. s.