

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,  
w dyscyplinie nauki biologiczne**

**Pani mgr Bożeny Kowalczyk**

**pt. "Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów  
*Legionella pneumophila* serogrupa 1"**

**Promotor: dr hab. Marta Palusińska-Szys**

Legioneloza jest chorobą stanowiącą istotny problem zdrowotny w Polsce. Uważana często za chorobę związaną z podróżami do krajów śródziemnomorskich i przebywaniem w klimatyzowanych pomieszczeniach pozostaje nierozpoznana i pomijana w trakcie leczenia atypowych zapaleń płuc w Polsce. W 2023 r. w Rzeszowie zanotowano największe ognisko legionelozy w Polsce. Obejmowało ono 164 przypadki potwierdzone oraz 1 prawdopodobny. Retrospektywne epidemiologiczne badania prowadzone przez Państwową Inspekcję Sanitarną w Rzeszowie wykazały dodatkowo 129 przypadków zapalenia płuc, które jednak nie zostały zdiagnozowane ponieważ placówki opieki medycznej nie dysponowały odpowiednimi testami diagnostycznymi. Wystąpienie dużego ogniska legionelozowego zapalenia płuc nabytego w środowisku życia (tzw. Community-acquired Legionnaires disease, CALD) w Polsce spowodowało większe zainteresowanie pałeczkami *Legionella* sp. i prawdopodobnie większą dostępność testów – w pierwszych 4 miesiącach 2024 r. zgłoszono 3-krotnie więcej przypadków choroby legionistów niż w 2023 r. Bakterie *Legionella pneumophila* stanowią naturalny składnik biofilmu występującego w warunkach naturalnych oraz w środowisku sztucznym np. w instalacji wody ciepłej. Legionelozowe zapalenie płuc stanowi stan zagrażający zdrowiu i życiu chorego, szczególnie wśród osób z grup ryzyka, natomiast w przebiegu pozapłucnej postaci legionelozy, jaką jest gorączka Pontiac, obserwuje się samowyleczenie i krótki okres choroby. Różnice w przebiegu legionelozy są spowodowane stanem układu immunologicznego osoby narażonej na zakażenie, czasem ekspozycji oraz właściwościami zjadliwości drobnoustroju.

Rozprawa doktorska Pani mgr Bożeny Kowalczyk wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy, jakim jest poszukiwanie czynników odpowiedzialnych za zwiększoną zjadliwość bakterii *Legionella pneumophila* sg 1.

W badaniach Doktorantka skupiła się na strukturze czynników powierzchniowych bakterii *L.pneumophila* sg 1 i ich wpływie na wybrane właściwości wirulentne takie jak adhezja, wnikanie i namnażanie się bakterii wewnątrz komórek człowieka i ameb. Wybrała 2 dzikie szczepy bakterii *L.pneumophila* sg 1. Badania prowadziła z wykorzystaniem szczepów dzikich oraz udostępnionych/otrzymanych mutantów w obszarach związanych z procesem tworzenia LPS i jego strukturą, a także z wykorzystaniem tzw. szczepów komplementacyjnych.

Rozprawa doktorska przedstawiona jest w formie tradycyjnej – wszystkie materiały zebrano w pisemnym opracowaniu. Rozprawa doktorska liczy 161 stron druku, a jej układ jest typowy. Napisana jest w przystępny sposób, a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników. Do rozprawy dołączono także Aneks składający się z wymaganych zgód do prowadzenia badań z genetycznie modyfikowanymi drobnoustrojami, opublikowane wyniki w postaci publikacji (Doktorantka jest pierwszym autorem), naukowe curriculum vitae Doktorantki itp. Pomocny jest także załączony na początku rozprawy wykaz Skrótów stosowanych w pracy.

W obszernym, 33-stronnicowym Wstępie do rozprawy Doktorantka przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy: (I) przedstawia struktury powierzchniowe *L.pneumophila*, ze szczegółowym omówieniem budowy i właściwości lipopolisacharydu (LPS) i fosfolipidów; (II) przedstawia genetyczne podstawy biosyntezy poszczególnych części składowych LPS *L.pneumophila*; (III) prezentuje schemat klasyfikacji serologicznej *L.pneumophila* i porusza znaczenie LPS i fosfolipidów w procesach interakcji *L.pneumophila* z komórkami ameb i człowieka; (IV) krótko omawia chorobotwórczość bakterii *Legionella* sp. Ponadto omawia proces biosyntezy LPS na przykładzie *Escherichia coli*, zapewne jako najlepiej opisanego procesu biosyntezy LPS pałeczek Gram-ujemnych. Jest to jednak domniemanie Recenzenta i bardzo proszę o komentarz Doktorantki w tej sprawie. W opisie klasyfikacji serologicznej należy rozróżnić Panel Dresden czyli panel monoprzeciwciał służący do klasyfikacji bakterii *L.pneumophila* na podstawie właściwości antygenowych od metody, którą jest wykonywane to badanie. Metodą tą jest np. test mikroaglutynacji (MAT).

Wstęp stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do struktury i biosyntezy LPS bakterii *L.pneumophila* sg 1 i uzasadnienie wyboru zakresu badań w ramach rozprawy doktorskiej. Zdaniem Recenzenta, zabrakło szerszego omówienia w jaki sposób pałeczki *Legionella* sp. modulują wrodzoną odpowiedź immunologiczną człowieka, tak aby uzasadnić wybór badanych cytokin. Bardzo proszę Doktorantkę o uzasadnienie wyboru badanych cytokin.

Doktorantka postawiła hipotezę roboczą, zakładającą, że specyficzne determinanty struktur powierzchniowych *L.pneumophila* sg 1, warunkują zdolność do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się w komórkach eukariotycznego gospodarza i modulują wrodzoną odpowiedź immunologiczną.

Doktorantka postawiła 5 głównych celów badawczych (zdaniem Recenzenta 4) w prezentowanej rozprawie doktorskiej:

(I/II) Analizę strukturalną LPS i lipidów *L.pneumophila* sg 1 – wybranych do badań szczepów dzikich i mutantów;

(III) Badanie biofizycznych oddziaływań między komórkami badanych szczepów i mutantów a komórkami gospodarza (badania z wykorzystaniem linii THP-1 oraz ameb *A.castellanii*)

(IV) Badanie zdolności do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się badanych szczepów i mutantów w komórkach *A.castellanii*, makrofagach linii THP-1 i komórkach nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B

(V) określenie zdolności komórek szczepów dzikich i mutantów oraz wyizolowanych z nich LPS – do indukcji wybranych cytokin (IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) w makrofagach linii THP-1.

Postawione cele odpowiadają zakresowi tytułu rozprawy doktorskiej tj. "Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* serogrupa 1".

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. Doktorantka prowadziła badania na dwóch szczepach dzikich *L.pneumophila* sg 1 (Heysham-1 i szczep 130b.), dwóch mutantach defektywnych w syntezie LPS (odpowiednio T6-K13 i 16D12) oraz 2 szczepów komplementacyjnych (T24-K6-1 i pJBBORF8).

W rozdziale nr 3. Materiały i Metody, przedstawiono pochodzenie mutantów defektywnych oraz szczepów komplementacyjnych natomiast zabrakło danych lub są niejasne nt. pochodzenia szczepów dzikich i ameb *A.castellanii*. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych danych.

W rozdziale nr 3 Materiały i Metody Doktorantka przedstawia szczegółowo stosowane podłoża, metodykę wykorzystaną w badaniach, zastosowane techniki. Ze względu na wielość zastosowanych technik i metod biologicznych, biofizycznych, chemicznych rozdział ten mieści się na 21 stronach.

W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno dotyczących:

- (1) hodowli bakterii, ameb, komórek linii komórkowych
- (2) metod uzyskania i charakterystyki poszczególnych składowych struktur powierzchniowych (delipidacja masy bakteryjnej, izolacja LPS, izolacja kwasów tłuszczowych lub węglowodanów z preparatów LPS, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, elektroforeza SDS-Page, barwienia azotanem srebra, elektrodializa LPS, chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, rozdział LPS na kolumnie G50)
- (3) metod biologicznych: test adhezji, infekcji *L.pneumophila* do komórek ameb i makrofagów, komórek nabłonkowych; test inwazji *L.pneumophila* do komórek ameb i makrofagów; badanie poziomu cytokin prozapalnych w płynie pochodzącym z linii makrofagów THP-1 stymulowanych badanymi szczepami *L.pneumophila* i indukowanych LPS wyizolowanym z tych szczepów; oznaczanie TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ .
- (4) statystycznych (szereg testów, w tym test ANOVA, test post hoc Tukey'a, test t- Studenta).

Wszystkie stosowane metody i techniki zostały wyczerpująco opisane, z wyjątkiem zastosowanych kontroli, szczególnie ujemnych. Wyniki kontroli prezentowane są w rozdziale IV Wyniki na wielu rycinach czy w tabelach (np. tab.6, Ryc.47), ale brak jest opisu ich przygotowania, składu itp. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych danych w trakcie prezentacji lub w odpowiedzi na uwagi.

Mimo tych niedociągnięć, należy stwierdzić, że stosowanie bardzo rozmaitych, poprawnie dobranych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę. Bardzo proszę Doktorantkę o potwierdzenie, że wszystkie przedstawione badania np. metodami biofizycznymi np. FLIM, prowadzone były przez nią osobiście lub przy Jej udziale.

Rozdział IV Wyniki Badań - uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 4 tabelach (jedna w aneksie) i na 41 rycinach. Generalnie wszystkie tabele, ryciny zawarte w pracy są czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników, jednak zawsze warto wyróżniać opisywane elementy np. zaznaczyć prążek stanowiący o różnicach pomiędzy badanymi szczepami na rycinie prezentującej rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE LPS lub widma  $^1\text{H}$  NMR (warto o tym pomyśleć przygotowując prezentację). Warto także zwracać uwagę na różną skalę w prezentowanych wynikach (np. Ryc.37).

Kolejna uwaga to przygotowanie tabeli (lub prezentacja w inny sposób) podsumowującej uzyskane główne wyniki w danej części np. główne wyniki analizy chemicznej wskazujące na różnice w profilach składu LPS, lipidów czy glicerydów badanych szczepów dzikich i mutantów defektywnych; czy też stwierdzone główne różnice w badaniach biofizycznych i biologicznych. Takie tabele lub jedno podsumowanie wszystkich głównych wyników byłoby bardzo przydatne, także przy formułowaniu wniosków.

Analiza uzyskanych wyników oraz ich dyskusja na 13 stronach rozprawy doktorskiej (rozdział V Dyskusja), połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest aktualne, obszerne i obejmuje 233 pozycje.

W rozdziale nr VI. Podsumowanie i Wnioski, Doktorantka w bardzo skrótowy sposób dokonała podsumowania pracy i sformułowała 6 wniosków. W mojej ocenie są one niepełne i w części stanowią raczej główne wyniki (wniosek nr 1, 2, 5). Brakujące elementy wniosków można znaleźć w rozdziale V. Dyskusja. Bardzo proszę Doktorantkę aby uzupełniła i przedstawiła na obronie pracy doktorskiej pełne wnioski, szczególnie w nawiązaniu do tytułu rozprawy doktorskiej.

W rozprawie doktorskiej, Pani mgr Bożena Kowalczyk, w wyniku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy, uzyskała szereg interesujących wyników. Za najcenniejsze elementy rozprawy doktorskiej uważam:

1. opracowanie modelu badawczego umożliwiającego analizę wpływu poszczególnych modyfikacji struktur powierzchniowych *L.pneumophila* sg 1 na proces interakcji między bakteriami a komórkami gospodarza;
2. identyfikację obszarów genomu odpowiedzialnych za modyfikację struktury LPS *L.pneumophila* sg 1;
3. powiązanie określonych modyfikacji w strukturze LPS *L.pneumophila* sg 1 ze zmianami biofizycznych interakcji między bakterią a komórką gospodarza;
4. potwierdzenie wyników innego zespołu badawczego, wskazujących na istnienie różnych mechanizmów przyłączania się *L.pneumophila* sg 1 do różnych komórek eukariotycznych - co może mieć istotne znaczenie w leczeniu/zapobieganiu zakażeniom;
5. bardzo ważnym aspektem pracy było badanie wpływu modyfikacji w strukturze LPS na właściwości biologiczne badanych szczepów, szczególnie na indukcję/stymulację wytwarzania wybranych cytokin.

W mojej opinii, uzyskane wyniki stanowią wstęp do kolejnych, bardzo interesujących badań nad mechanizmami zjadliwości *Legionella* sp., procesami modulacji odpowiedzi immunologicznej w wyniku zakażenia a także być może – opracowania leków skutecznych w leczeniu/zapobieganiu legionelozie (o czym wspominała Doktorantka).

Bardzo proszę Doktorantkę o komentarze i odpowiedzi na wcześniej zadane pytania w tej recenzji rozprawy doktorskiej.

Ponadto rozprawa doktorska zawiera liczne drobne uchybienia, literówki, określenia żargonowe.

Przedstawione powyżej uwagi dotyczące wszystkich rozdziałów nie umniejszają zasadniczej zawartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo pozytywnie.

#### **Wniosek:**

W oparciu o powyższą recenzję, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Bożeny Kowalczyk pt. "Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* serogrupa 1" spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. oraz wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Bożeny Kowalczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z uwagi na wysoką wartość prezentowanej rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.

Warszawa, dnia 11.06.2024 r.

KIEROWNIK  
Laboratorium BSL3 NIZP-PZH  
*Katarzyna Pancer*  
dr hab. Katarzyna Pancer