



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; andrzej.gamian@hirszfeld.pl

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 3.06.2024r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Bożeny Kowalczyk pt. „Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* serogrupa 1” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Palusińskiej-Szys, prof. UMCS

Praca dotyczy badań nad wirulencją szczepów *Legionella pneumophila*, ważnego patogenu człowieka, wywołującego legionellozę. Przedmiotem badań w tej pracy jest obok lipidów lipopolisacharyd (LPS), jedna z najważniejszych struktur powierzchniowych tych bakterii. Biorąc pod uwagę wewnątrzkomórkowy charakter zakażeń wywoływanych przez szczepy *Legionella* i źródło epidemii, takich jak na przykład w Polsce w 2023 roku, wywoływanych przez te bakterie, choroba legionistów jest ważnym problemem medycznym. Dlatego badania nad tym patogenem mają istotne znaczenie biomedyczne, a wyniki mogą znaleźć wykorzystanie praktyczne w opracowywaniu nowych podejść terapeutycznych. Stąd podjęty temat pracy doktorskiej jest ważny i wychodzi naprzeciw aktualnych potrzeb medycyny. Tematyka tych badań wywodzi się z dorobku Instytutu Nauk Biologicznych na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, jest efektem bogatego dorobku zespołu w tej dziedzinie. Badania procesów zakażenia komórek gospodarza przez patogeny wewnątrzkomórkowe i mechanizmów odpornościowych mieszczą się w najważniejszych trendach światowych w biochemii i medycynie. Badaniami objęto dwa szczepy kliniczne i po dwie pary mutantów w syntezie LPS, aby sprawdzić wpływ zmian w budowie LPS na proces infekcji komórkowej. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów, część metodyczną, wyniki i dyskusję z podsumowaniem i wnioskami oraz spis piśmiennictwa. Aneks zawiera zgody na użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych, dodatkową tabelę z wynikami analiz składu lipidowego dwóch mutantów oraz pełny tekst publikacji z *Int. J. Mol. Sci.* i spis dorobku Kandydatki. Praca zawiera 199 stron maszynopisu wraz z 50 rysunkami i 6 tabelami, cytowanymi 233 pozycjami piśmiennictwa. We

wstępie do rozprawy autorka podaje charakterystykę bakterii z rodzaju *Legionella*, ich chorobotwórczość, budowę struktur powierzchniowych, lipopolisacharydu z omówieniem poszczególnych jego części, następnie biosyntezę tych regionów na przykładzie dobrze poznanej u *E. coli*, by przejść do omówienia genetycznych podstaw biosyntezy tych regionów LPS u *Legionella*. Dalej opisuje fosfolipidy *Legionella*, biosyntezę fosfatydylocholiny i rolę lipidów *L. pneumophila* w oddziaływaniach z komórką gospodarza. Osobny rozdział poświęca klasyfikacji serologicznej szczepów *L. pneumophila* sg 1. Wstęp podsumowuje opisem biologicznego znaczenia LPS i fosfolipidów *L. pneumophila*. Celem badań była identyfikacja struktur ściany komórkowej, które są odpowiedzialne za zwiększoną wirulencję szczepów *L. pneumophila* sg 1, poprzez analizę strukturalną składników powierzchniowych ściany komórkowej, badania oddziaływań z komórkami gospodarza i wewnątrzkomórkowego namnażania szczepów bakterii dzikich i mutantów.

W części dotyczącej Materiałów i Metod autorka opisuje użyte szczepy bakteryjne, dwa kliniczne wyjściowe, po dwa mutanty z defektem w strukturze LPS i dwa szczepy komplementacyjne odpowiednio względem mutacji. Następnie opisuje podłoża hodowlane i warunki hodowli bakterii, ameb i komórek ludzkich, także delipidacji masy bakteryjnej i otrzymywania LPS. Dalej przybliża metody biochemiczne jak elektroforezę SDS-PAGE, analizy instrumentalne UHPLC-MS/MS, GLC-MS, NMR, elektrodializę LPS, izolację i analizę kwasów tłuszczowych, cukrów, frakcjonowanie materiału cukrowego. W dalszej części opisano metodę mikroskopii FLIM do badania oddziaływań międzycząstekowych, testy adhezji, infekcji i inwazyjności komórek bakteryjnych do ameb, makrofagów i nabłonka, badania indukcji cytokin TNF- α , IL-6 i IFN- γ . Na końcu podano metody analiz statystycznych. Metody są dobrze opisane, opatrzone fotografią morfologii kolonii, tabelami z podaniem wydajności preparacji LPS i polisacharydu, przez co rozdział jest klarownym wywodem.

Pierwsze doświadczenia pozwoliły wykazać metodą elektroforezy w żelu, że mutanty są defektywne w strukturze LPS, podczas gdy komplementanty są podobne do dzikich szczepów, co potwierdziły analizy składowe kwasów tłuszczowych i widm NMR domen polisacharydowych. Następnie autorka wykazała przez pomiar emisji fluorescencji barwnika oddziałującego z powierzchnią komórki, że mutanty mają bardziej hydrofilową powierzchnię niż ich szczepy dzikie, co jest zgodne z wynikami analiz NMR że nastąpiła u mutantów utrata grup *O*-acetylowych i *N*-metylowych. Analizy oddziaływań komórek *L. pneumophila* z komórkami ameb i linii THP-1 wskazały na silniejsze oddziaływania z bakteriami szczepów dzikich i komplementata niż mutantów, chociaż szczepy 130b i 16D12 nie oddziaływały z

komórkami THP-1. Obrazy adhezji do komórek THP-1 i ameb szczepów dzikich i komplementantów były podobne, podczas gdy komórki mutantów wykazywały zróżnicowanie właściwości adhezyjnych, słabsze do makrofagów i podwyższone do ameb, co sugerowało znaczenie grup *O*-acetylowych w adhezji do makrofagów. Interesująca była wysoka adhezyjność mutantów do komórek nabłonkowych. Badania infekcyjności wykazały, że jeden z mutantów wyraźnie lepiej namnażał się w komórkach ameb, makrofagów i nabłonkowych niż szczep dziki. Jednak inwazyjność mutantów nie była jednoznacznie wyższa w warunkach testu. Odnośnie indukcji badanych cytokin, komórki szczepów dzikich i mutantów były słabymi induktorami, natomiast LPS indukował w THP-1 w sposób dawkozależny TNF- α i znacznie niższy poziom IL-6. Mutant szczepu dzikiego 130b nie stymulował wytwarzania cytokiny TNF- α , co może oznaczać, że obecność grup *O*-acetylowych części rdzeniowej wpływa na produkcję TNF- α przez komórki makrofagowe linii THP-1. Wyniki mają wartość podstawową, referencyjną w zakresie poznawania mechanizmów patogenezy zakażeń *Legionella pneumophila*, co może mieć znaczenie przy konstruowaniu szczepionki przeciwko tym patogenom.

Dyskusja jest przeprowadzona bardzo dobrze, poszczególne doświadczenia są omówione krytycznie, autorka umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki, w odniesieniu do piśmiennictwa. Interesujące dane uzyskano odnośnie zawartości ceramidów, gdyż mutant syntezował dwa razy więcej ceramidów Cer(t34:0) i Cer(t38:0) niż szczep dziki. W odniesieniu do problemu wewnątrzkomórkowego namnażania bakterii *Legionella pneumophila* chciałbym zapytać doktorantkę na temat dostępnych danych o odmienności powierzchni komórki bakteryjnej wewnątrz komórki gospodarza od jej powierzchni poza komórką gospodarza, gdyż w przypadku *Salmonella* da się zaobserwować takie zjawisko. Wyniki zostały częściowo opublikowane, w rozprawie dodano blisko 70% rysunków, wkład poszczególnych współautorów w publikacji jest wyszczególniony, świadczący o dominującej roli doktorantki w powstanie publikacji, w sumie rozprawa jest bezsprzecznie autorskim dokonaniem doktorantki, interdyscyplinarnym podejściem do rozwiązania postawionego zadania.

Odnośnie uwag krytycznych dotyczą one strony redakcyjnej i to w niewielu punktach. Na str. 55 jest 2 N KOH, potem 2M KOH, chodzi o ujednoczenie zapisu, tutaj 2M, podobnie ...Erlenmayer`a, a dalej Petriego, na str. 59 podano że próbki zawieszono w 1 ml mieszaniny B zawierającej 10% chloroformu... trudno znaleźć skład tej mieszaniny. Na str. 64 mowa o estrach metylowych kwasów tłuszczowych przekształczanych w pochodne trimetylosililowe, a dalej jest informacja, że kwasy tłuszczowe analizowano w formie estrów metylowych, proszę o

wyjaśnienie czy obie formy były analizowane w GLC/MS (raczej nie GC/MS). U dołu tej str. są wymiary kolumny, czy chodzi o 30 mm czy 30 m jej długości?. Punkt 3.13 dotyczy raczej rozdziału materiału węglowodanowego, a nie całego LPS na kolumnie Sephadex G-50, szkoda że nie pokazano obrazu rozdziału na frakcję wysoko i niskocząsteczkową. Na str. 84 powinno być odpowiednio ...tabel 14 i 15. Na Rycinie 46 nie są jasne podpisy dla B) i C). Na str. 131 i w tekście lepiej nazywać GAG jako glikozaminoglikany dla szerszej grupy związków. Odnośnie terminologii użyto określenia raczej żargonowego ...szczepów legionell...(czy też salmonell?). Podsumowując, należy podkreślić że nie mam uwag krytycznych do pracy o dużej wartości, dobrze zaplanowanej i wykonanej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które stanowią podstawę do dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do poszerzenia wiedzy o udziale głównych struktur powierzchniowych *Legionella* w infekcyjności komórek ludzkich. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Bożeny Kowalczyk zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 roku poz. 742). Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Bożeny Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.