

Łódź, 21.05.2024 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski  
Katedra Biologii Bakterii  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Bożeny Kowalczyk**

pt. „Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów

*Legionella pneumophila* serogrupa 1”

Mgr Bożena Kowalczyk jest doktorantką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Rozprawę doktorską wykonała w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii w Instytucie Nauk Biologicznych pod opieką dr hab. Marty Palusińskiej-Szysz, prof. UMCS. Praca była realizowana w ramach projektu pt. „Bakteryjne determinanty wirulencji szczepów *Legionella pneumophila* sg.1” kierowanego przez Promotor doktoratu na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie w Instytucie Nauk Biologicznych, finansowanego z funduszy NCN.

Obiektem badań mgr B. Kowalczyk były bakterie *Legionella pneumophila* serogrupy 1. Pałeczki te są zdolne do namnażania się w komórkach wolnożyjących pierwotniaków, należących do gromady *Ameobozoa*. Są też zdolne do wzrostu w biofilmach, także wielogatunkowych oraz do przeżycia w środowisku wodnym, z reguły o charakterze oligotroficznym. Stanowią zagrożenie, gdyż mogą pojawiać się w systemach wodociągowych, skąd w formie aerozolu mogą rozprzestrzeniać się, powodując infekcje u ludzi, zwłaszcza u osób starszych i u osób z obniżoną odpornością immunologiczną. W Polsce w ubiegłym roku przekonaliśmy się o tym, jak te patogeny są groźne, spowodowały bowiem zakażenia u ludzi

w kilku miejscowościach, z Rzeszowem i okolicami, gdzie zanotowano największą liczbę zakażeń. Zakażenia *L. pneumophila* przybierają dwie postacie kliniczne: chorobę legionistów, która pierwotnie została opisana w USA i dała nazwę schorzeniu oraz samoograniczającą się infekcję grypopodobną, zwaną gorączką Pontiac. Pierwsza z wymienionych chorób stanowi ciężkie zapalenie płuc, szczególnie u osób jak już wspomniałem starszych, z osłabioną funkcją układu odpornościowego, poddanych immunosupresji, czy z chorobami współistniejącymi. Gorączka Pontiac to łagodniejsza postać infekcji, z wieloma objawami, ale bez zapalenia płuc i konieczności specjalistycznego leczenia. Spośród 72 zidentyfikowanych gatunków rodzaju *Legionella*, *L. pneumophila* jest najczęstszą przyczyną choroby legionistów (90 % zakażeń), a wśród nich 80% wywołują szczepy *L. pneumophila* zaliczane do serogrupy 1. Dlatego też zainteresowanie się przez Doktorantkę powierzchniowymi składnikami tych bakterii należy uznać za w pełni zasadne, tym bardziej, iż udział lipidowych elementów powierzchniowych komórek *L. pneumophila* tj. lipopolisacharydu (LPS) i fosfolipidów w patogenezie zakażeń tymi pałeczkami nie jest dobrze poznany.

Mgr B. Kowalczyk założyła, iż składniki powierzchniowe *L. pneumophila* sg1 mogą warunkować zdolność do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się bakterii w komórkach gospodarza oraz mogą modulować odpowiedź immunologiczną w trakcie zakażenia. Cele szczegółowe pracy powiązane z tą hipotezą badawczą objęły: analizę struktury chemicznej LPS 2 szczepów dzikich *L. pneumophila* sg1 oraz mutantów; ustalenie struktury lipidów wyizolowanych ze szczepów dzikich i mutantów; badania biofizyczne oddziaływań pomiędzy bakteriami szczepów dzikich i mutantów i makrofagami linii THP-1 oraz komórkami *Acanthamoeba castellanii*; badania zdolności do adhezji i wewnątrzkomórkowego namnażania się szczepów dzikich i mutantów w komórkach *A. castellanii* i w makrofagach linii THP-1 oraz komórkach nabłonkowych linii A549 (komórki nabłonka pęcherzyków płuc człowieka, pochodzących z gruczolaka płuc) i BEAS-2B (linia komórek nabłonka oskrzeli człowieka); określenie zdolności komórek szczepów dzikich i mutantów, a także wyizolowanych z tych szczepów lipopolisacharydów, do indukcji cytokin w makrofagach linii THP-1. Doktorantka wskazała, iż wyniki jej badań tj. ustalenie markerów ściany komórkowej mających udział w determinacji wirulencji bakterii, mogą być pomocne w zrozumieniu mechanizmów pobierania bakterii, ich wewnątrzkomórkową proliferację oraz odpowiedź

gospodarza, a w konsekwencji przyczynić się do opracowania nowych leków i skutecznych schematów leczenia choroby legionistów.

Oceniana rozprawa doktorska mgr B. Kowalczyk ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich i składa się z następujących rozdziałów Wstępu, Hipotezy i Celu pracy, Materiałów i Metod, Wyników Badań, Dyskusji, Podsumowania i Wniosków, Bibliografii i Aneksu. Rozdziały te uzupełniają Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Wykaz skrótów stosowanych w pracy.

We Wstępie Doktorantka scharakteryzowała bakterie z rodzaju *Legionella*, przedstawiła schorzenia, które są następstwem zakażenia tymi pałeczkami oraz najważniejsze czynniki warunkujące infekcje. Dużą część Wstępu poświęciła budowie składników powierzchniowych bakterii *L. pneumophila*. Omówiła trzy regiony LPS: część O-swoistą, region rdzeniowy oraz lipid A, z jego zróżnicowanym profilem kwasów tłuszczowych, stanowiącym kryterium wykorzystywane w taksonomii bakterii z rodzaju *Legionella*. Kolejny rozdział Wstępu mgr B. Kowalczyk poświęciła biosyntezie LPS, co omówiła na przykładzie pałeczek *Escherichia coli*. To omówienie było punktem wyjścia do przedstawienia zespołu genów *L. pneumophila* kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę LPS tych bakterii. W tym miejscu chciałbym zapytać Doktorantkę, czy biosynteza LPS *L. pneumophila* jest w takim samym stopniu poznana jak u *E. coli*, tzn. czy wyizolowano i ustalono struktury chemiczne produktów pośrednich tego procesu. Mgr B. Kowalczyk opisała także zróżnicowanie składu fosfolipidów błon *L. pneumophila* oraz ich rolę w interakcjach z komórkami gospodarza. We Wstępie znalazł się też rozdział poświęcony klasyfikacji serologicznej szczepów *L. pneumophila* sg1.

Przegląd informacji zaprezentowanych we Wstępie świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań doświadczalnych. Wykazała się dobrą znajomością literatury, przedstawiając kompleksowo obiekt badań – pałeczki *Legionella*, w tym budowę ich LPS, a także zróżnicowanie w zakresie występowania fosfolipidów u tych bakterii oraz biologiczne znaczenie obu tych komponentów zewnętrznych osłon komórek.

Cel badań, który przedstawiłem wyżej, został precyzyjnie i wyczerpująco sformułowany.

W pracy wykorzystano bakterie *L. pneumophila* - dwa szczepy dzikie Heysham-1 i 130b, mutanty defektywne w syntezie LPS, odpowiednio T6-K13 i 16D12 oraz szczep komplementacyjny T24-K6-1 względem mutacji w szczepie T6-K13. Szczepy te otrzymano dzięki współpracy z Instytutem Mikrobiologii Medycznej i Higieny Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie w Niemczech. Szczepy *L. pneumophila* Heysham-1 i *L. pneumophila* 130 b zostały wyizolowane do pacjentów z rozpoznaną chorobą legionistów. Otrzymano też w trakcie realizacji doktoratu konstrukt genetyczny szczepu komplementacyjnego pJBBORF8, względem mutacji występującej w szczepie 16D12. Opis hodowli bakterii i stosowanych podłoży przedstawiono wyczerpująco. Odnosi się to także do hodowli ameb *A. castellanii*, makrofagów linii THP-1 oraz komórek nabłonkowych dróg oddechowych linii A549 i BEAS-2B. W pracy wykorzystano szereg metod analitycznych, chromatograficznych, elektroforetycznych oraz służących analizie struktury chemicznej poszczególnych składników LPS oraz fosfolipidów, w tym spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Doktorantka badała lipopolisacharydy *L. pneumophila* otrzymane wg met. Apicella i wsp. oraz Westphala. Nie przedstawiła w Metodach informacji o pierwszej z wymienionych metod. Do zbadania oddziaływania szczepów *L. pneumophila* z *A. castellanii* oraz z makrofagami linii THP-1 wykorzystano mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) oraz metodę transferu energii rezonansu Forstera (FRET – Forster Resonance Energy Transfer). Testy adhezji, infekcji i inwazji pozwoliły ocenić zdolności *L. pneumophila* do kolonizacji makrofagów linii THP-1, a testy adhezji i infekcji zdolności do kolonizowania linii komórkowych A549 i BEAS-2B. Sprawdzono też zdolność LPS wyizolowanego ze szczepów dzikich i mutantów oraz szczepów komplementacyjnych do stymulacji komórek linii THP-1 do wytwarzania cytokin TNF- $\alpha$ , IL-6 i IFN- $\gamma$ .

Zwraca uwagę bogata paleta zastosowanych metod badawczych. Są dobrze dobrane w stosunku do postawionych celów badawczych. Potwierdza to dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki do podjęcia badań doświadczalnych.

Właściwe wykorzystanie bogatego zestawu technik i metod badawczych pozwoliło mgr B. Kowalczyk 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.

Porównanie obrazów elektroforezy LPS szczepów dzikich, mutantów i komplementantów wskazało na różnice w budowie tego heteropolimeru. Znalazło to wyraz w wynikach analizy chemicznej i badaniach strukturalnych LPS z tych szczepów. Wykazano różnice ilościowe w składzie kwasów tłuszczowych LPS pomiędzy szczepami dzikimi i mutantami, natomiast profil kwasów tłuszczowych komplementantów był zbliżony do profilu kwasów tłuszczowych szczepów dzikich. Potwierdzono, iż polisacharyd O-swoisty mutantu T6-K13 jest zbudowany jest z reszt kwasu legionaminowego połączonych wiązaniami 2,4. Ustalono strukturę regionu rdzeniowego szczepu Heysham-1. Badania PS *L. pneumophila* 130b, jego mutantu 16D12 i szczepu komplementanta pJB180R78 pozwoliły na stwierdzenie, że grup N-CH<sub>3</sub> brak w kwasie legionaminowym mutantu. Ponadto wykazano, iż w badanych mutantach brak też grup O-acetylowych w cukrach regionu rdzeniowego. Miało to wpływ na skład lipidów. Bakterie nie wytwarzające rdzenia podstawionego grupami O-acetylowymi oraz kwasu legionaminowego z podstawnikami acetimidowymi wytwarzają lipidy obojętne, sfingolipidy i ceramidy o zmienionym profilu w stosunku do szczepów dzikich. Wykazane zmiany znalazły odzwierciedlenie w wynikach badań oddziaływań bakterii z komórkami gospodarza. Wykazano, iż szczep dziki 130b charakteryzował się wyższym stopniem hydrofobowości w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham-1, podobnie mutant 16 D12 w stosunku do mutantu T6-K13 . Stwierdzono różnice w oddziaływaniu badanych szczepów z komórkami *A. castellani* i makrofagami linii THP-1. Szczep T6-wykazywał mniejszą zdolność do adhezji do makrofagów THP-1, niż szczep dziki Heyszham-1, ale większą zdolność do adhezji do *A. castellani*. Szczep 16D12 bardzo słabo wiązał się z makrofagami, w porównaniu ze szczepem dzikim i komplementantem. Większą zdolność do adhezji wykazywał w stosunku do *A. castellani*. Mutant T6-K13 był w większym stopniu zdolny przylegać do komórek nabłonkowych A549 i BEAS-2B, niż szczep dziki. Podobną zależność wykazano dla szczepu 16D12. Stwierdzono też, że mutant T6-K13 bardzo efektywnie namnażał się tak w makrofagach THP-1, jak i komórkach *A. castellani*. Doktorantka napisała na str. 114 rozprawy, iż mutant 16D-12 namnażał się słabiej w komórkach THP-1 w porównaniu do szczepu dzikiego. Moje pytanie – czy wyniki zamieszczone na ryc. 42 (tej ze str. 114, bo są dwie ryciny 42, druga na stronie 113), odnoszące się do tych szczepów są istotne statystycznie. Stwierdzono też, iż mutant ten znacznie lepiej namnażał się wewnątrz ameb, zwłaszcza w dłuższym okresie inkubacji. Test infekcji komórek A549 i BEAS-2B przez *L. pneumophila* wykazał różnice w zdolnościach szczepów dzikich i mutantów do wewnątrzkomórkowego namnażania się. W

tych komórkach mutant T6-K13 lepiej namnażał się, w porównaniu do szczepu dzikiego Heysham i odwrotnie szczep dziki 130b charakteryzował się wyższymi zdolnościami do wewnątrzkomórkowego namnażania się, w porównaniu do mutantu 16D12. Wykazano też duże różnice w stymulowaniu komórek linii THP-1 przez LPS badanych szczepów do wytwarzania TNF- $\alpha$  i IL-6. Poziom IL-6 po indukcji obył niższy, niż poziom TNF- $\alpha$ .

Mgr B. Kowalczyk zrealizowała założone cele pracy. Wnioski znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach. Głównym osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest powiązanie grup O-acetylowych przyłączonych do reszt ramnozowych rdzenia LPS i grup N-metylowych przyłączonych do podstawników acetimidoidowych kwasu legionaminowego części O-swoistej LPS, ze zdolnościami do adhezji, inwazji i wewnątrzkomórkowego namnażania się bakterii *L. pneumophila* w komórkach *A. castellanii* i makrofagach linii THP-1 oraz w komórkach nabłonkowych linii A549 i BEAS-2B.

Dyskusja własnych wyników badań Doktorantki na tle danych z literatury zasługuje na wysoką ocenę. Zestawienie literatury w liczbie 233 pozycji obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie.

Na str. 124 Autorka zamieściła informację, iż wyniki badań przeprowadzone na szczepach Heysham-1, T6K-13 i T24-K6-1 zostały opublikowane w pracy zamieszczonej w *Int. J. Mol. Sci.*, której kopia znalazła się w Aneksie. Wyniki te zostały umieszczone w rozprawie doktorskiej. Czy nie lepiej byłoby w rozprawie umieścić wyniki dotyczące drugiego zestawu badanych szczepów *L. pneumophila* i odbitkę tej publikacji. Dużą część Wstępu można było też zastąpić bardzo dobrym artykułem przeglądowym (*Int. J. mol. Sci.* 2021, 22, 1487). Rozprawy w takiej formie są, o ile wiem, akceptowane.

Doktorantka zamieściła swój życiorys naukowy. Legitymuje się już bogatym dorobkiem. Jest współautorką 10 publikacji oryginalnych i 9 rozdziałów w monografiach. Jest też współautorką 17 komunikatów na konferencjach krajowych i 10 międzynarodowych. Była wykonawcą grantu finansowanego przez NCN i kierowała 2 grantami finansowanymi przez macierzystą uczelnię. Warta podkreślenia jest też jej działalność popularyzatorska i w zakresie promocji nauki.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Bożeny Kowalczyk pt. „Rola składników powierzchniowych w zwiększonej wirulencji szczepów *Legionella pneumophila*

serogrupa 1" spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antoni Rejzalski