

Łódź, 8.08.2015 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Zakład Immunobiologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Bartłomieja Dudka**

pt. „Udział lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w kształtowaniu
wrażliwości pałeczek z rodzaju *Salmonella* na bakteriobójcze działanie
surowicy”

Rozprawa doktorska mgr B. Dudka stanowi kontynuację badań podjętych wcześniej w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Są to badania wieloaspektowe bójczego działania surowicy na bakterie Gram-ujemne. W ostatnich latach zespół naukowy kierowany przez Promotora dr hab. Gabriłę Bugłę-Płoskońską, prof. UWr., we współpracy z innymi ośrodkami badawczymi w Polsce, w tym z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, skąd pochodzi promotor pomocniczy dr hab. Jacek Rybka, prof. PAN, zajął się ustalaniem roli składników błony zewnętrznej tych bakterii, w tym przede wszystkim lipopolisacharydu (LPS) i białek w oporności bakterii na działanie dopełniacza (komplementu). Jest to ważna cecha chorobotwórczości umożliwiająca im unikanie działania MAC (membrane attack complex) tj. kompleksu białek dopełniacza powodującego lizę komórki bakteryjnej. Wspomniany zespół badawczy analizuje wzajemne relacje pomiędzy składnikami błony zewnętrznej bakterii, a ich wrażliwością lub opornością na działanie surowicy m.in. znaczenia kwasu sjałowego (*N*-acetylo-neuraminowego), długości łańcuchów O-swoistych LPS, czy też występowania określonych białek. Wyniki tych badań stanowią ważny wkład w zrozumienie

wzajemnych interakcji pomiędzy składowymi systemu immunologicznego człowieka, w tym układu dopełniacza oraz elementami błony zewnętrznej (OM) ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Praca doktorska mgr B. Dudka mieści się w tym nurcie badawczym, a jej wyniki znacząco wzbogacają naszą wiedzę na temat bakteriobójczego działania dopełniacza na pałeczki *Salmonella*.

Rozprawa mgr B. Dudka ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W obszernym Wstępie Autor przedstawił charakterystykę rodzaju *Salmonella*, ich współczesną klasyfikację, rodzaje chorób które wywołują, a także dane epidemiologiczne dotyczące salmonelloz na świecie z wyodrębnieniem informacji odnoszących się do sytuacji, jaka ma miejsce pod tym względem w Polsce. Szczegółowo przedstawił mechanizmy patogenezy pałeczek *Salmonella* oraz udział układu dopełniacza w obronie makroorganizmu przed zakażeniem. W oddziaływaniu dopełniacza z bakteriami szczególną rolę odgrywają struktury występujące na ich powierzchni. W tym kontekście Doktorant przedstawił budowę tych składników błony zewnętrznej, które mają szczególne znaczenie w interakcji z komplementem. Opisał budowę i funkcję LPS i scharakteryzował białka OM. Dużo miejsca we Wstępie poświęcił kwasom sjałowym, przede wszystkim ich roli w zjawisku mimikry antygenowej, tj. upodabnianiu się antygenów bakterii do składników komórek gospodarza oraz znaczeniu tych kwasów w patogenezie bakterii.

Dane przedstawione we Wstępie jak i ich analiza świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta do podjętych badań eksperymentalnych. Wykazał się dobrą znajomością literatury, omówił najważniejsze kwestie wiążące się z zdaniami badawczymi przewidzianymi do realizacji w doktoracie. Moja uwaga krytyczne odnosząca się do Wstępu dotyczy dwóch rozdziałów, które nie mają związku z badaniami podjętymi w pracy doktorskiej, tj. opisu biosyntezy LPS oraz biosyntezy białek OM. Autor nie badał tych procesów i moim zdaniem nie było potrzeby je szczegółowo omawiać. Doktorant wydaje się być świadom tego, gdyż na str. 147

usprawiedliwia się dlaczego we Wstępie „autor pozwolił sobie zawrzeć podrozdziały i opisy potencjalnie niebędące ściśle tematem badań eksperymentalnych prowadzonych w ramach tej rozprawy doktorskiej”.

Cel pracy sformułowano klarownie, przedstawiając cel ogólny i przewidywane etapy badań konieczne do jego realizacji. Głównym celem badań było ustalenie znaczenia LPS i białek OM szczepów *Salmonella* w bakteriobójczym działaniu surowicy. Cel ten postanowiono zrealizować m.in. poprzez badania bakteriobójczej aktywności surowicy wobec bakterii, poszukiwania kwasu sjałowego w LPS, analizę proteomiczną białek OM i zróżnicowania długości łańcucha polisacharydowego części O-swoistej LPS. Badania uzupełniono o określenie filogenetycznego pokrewieństwa badanych szczepów *Salmonella* oraz wykrywanie genów kodujących wybrane cechy wirulencji tych bakterii. Intryguje mnie użyte w Celu pracy, a także w tytule określenie „kształtowanie wrażliwości”, zaś w Tabeli 10 „kształtowanie poziomu wrażliwości” bakterii na działanie surowicy. Czy Autor mógłby wyjaśnić jak to sformułowanie należy rozumieć w kontekście badań wrażliwości/oporności bakterii na jej działania.

Materiał do badań stanowiły 82 kliniczne szczepy *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis wyizolowane z kału pacjentów, 11 spośród nich Doktorant użył w badaniach wrażliwości na działanie normalnej surowicy ludzkiej (NSL). Ich identyfikację przy użyciu Bruker Daltonik MALDI Biotyper opisano w pierwszym podrozdziale rozdziału Materiał i Metody. Analizie, na obecność kwasu sjałowego, poddano wszystkie 82 izolaty pałeczek *Salmonella*. Zastosowano w tym celu metodę - tendemową spektrometrię mas sprzężoną z chromatografią gazowo-cieczową, opisaną wcześniej przez Promotora pomocniczego i współpracowników. W badaniach głównych wykorzystano test bakteriobójczego działania surowicy na szczepy *Salmonella* Enteritidis wg metody opracowanej przez Promotora pracy, w modyfikacji doktoranta, której zakres odnotował na str. 64 rozprawy. W pracy wyizolowano LPS z badanych

bakterii oraz sprawdzono, jaki rodzaj łańcuchów O-swoistych (długie, bardzo długie) wytwarzają. Zastosowano w tych badaniach standardowe metody w modyfikacji Doktoranta. Szczegółowo opisano także metody izolacji i analizy białek OM badanych szczepów bakterii, w tym elektroforezy jednokierunkowej oraz dwuwymiarowej, a także zastosowanej metody barwienia żeli. Wybrane białka identyfikowano posługując się techniką MALDI TOF. Filogenetyczne pokrewieństwo szczepów *Salmonella* ustalono posługując się metodą PFGE wg protokołu molekularnego subtypowania serotypów tych bakterii. Określono też obecność wybranych, 17 genów wirulencji w badanych szczepach *Salmonella* Enteritidis. Zastosowano metodę multiplex PCR, wykorzystując określone startery do amplifikacji genów.

Nie jest dla mnie w pełni jasne, dlaczego w badaniach używano różnej liczby szczepów np. występowania kwasu sjalowego poszukiwano w 82 szczepach bakterii, 11 szczepów poddano szczegółowym analizom w celu ustalenia ich wrażliwości na bakteriobójcze działanie surowicy, z kolei analizami filogenetycznego pokrewieństwa czy wykrywaniu genów, kodujących cechy wirulencji objęto 42 izolaty. W szczególności proszę podczas obrony rozprawy o wyjaśnienie na jakiej podstawie wyselekcjonowano 11 szczepów, które zostały wykorzystane w badaniach podstawowych w doktoracie tj. bakteriobójczym działaniu NSL. Niezależnie od przedstawionych wyżej uwagi stwierdzam, iż zastosowano metody i testy adekwatne do postawionych celów pracy i zadań badawczych. Zostały one dobrze dobrane, niektóre z nich były wypracowane, sprawdzone i stosowane we wcześniejszych badaniach naukowych macierzystego zakładu Doktoranta. Materiały i Metody zostały szczegółowo opisano w oddzielnym rozdziale doktoratu. Rozdział ten wskazuje na dobre przygotowanie praktyczne Doktoranta do podjęcia badań doświadczalnych, znajomość właściwych do realizacji pracy metod badawczych i umiejętność ich wykorzystania.

Wyniki badań zostały starannie opracowane i zaprezentowane. Podkreślam bogatą dokumentację pracy, w formie rycin, zdjęć i tabel zawartych w rozdziale Wyniki. Mgr B. Duda nie wykrył w badanych szczepach obecności kwasu sjalowego. Wyniki badań przeżywalności 11 szczepów *Salmonella* Enteritidis w 75% surowicy pozwoliły wyróżnić 3 szczepy (27, 851, 918) jako odporne, 3 szczepy (670, 888, 1120) jako wrażliwe i 5 (351, 920, 1227, 3686, 4574) jako średnio odporne na działanie bakteriobójcze NSL. Analiza elektroforetyczna LPS przeprowadzona w celu stwierdzenia ewentualnej korelacji pomiędzy długością O-swoistego łańcucha polisacharydowego (OPS), a efektem bójczym surowicy wykazała, iż badane szczepy wytwarzają długi lub bardzo długi łańcuch antygeny O. 10 szczepów bakterii zarówno opornych jak i średnio opornych na działanie bójcze NSL syntetyzuje bardzo długi łańcuch polisacharydu O-swoistego LPS, tylko 1 wytwarza długi OPS, ten ostatni okazał się być wrażliwym na działanie dopełniacza. Szczegółowej analizie poddano elektroforegramy dwuwymiarowej elektroforezy białek OM 11 badanych szczepów bakterii. Analiza porównawcza proteinogramów pozwoliła wybrać 8 grup białek oznaczonych przez Autora literami A-H do dalszych badań z wykorzystaniem techniki MALDI TOF. Białka te izolowano ze szczepów o różnej wrażliwości na działanie dopełniacza. Zidentyfikowano 5 białek przedstawionych w Tabeli 10. Analiza filogenetyczna wykazała, iż szczepy odporne charakteryzują się identycznym profilem genetycznym, zaś szczepy średnio odporne i wrażliwe innym. Badania genów wirulencji *Salmonella* w badanej w pracy kolekcji szczepów wykazały obecność tych genów u większości szczepów zarówno opornych jak i wrażliwych na działanie dopełniacza.

Podsumowując Mgr B. Dudek uzyskał ciekawe wyniki, których wnikliwą ocenę przedstawił w rozdziale Dyskusja. Jest to dobrze opracowana część rozprawy doktorskiej. Doktorant odnosi rezultaty swoich badań do danych otrzymanych wcześniej w macierzystej jednostce. Konfrontuje też uzyskane

dane z wynikami badań innych autorów wymienionych w bibliografii. Zestawienie literatury w liczbie 195 pozycji obejmuje najnowsze publikacje i dane ze źródeł internetowych. Wnioski znajdują potwierdzenie w zgromadzonych danych. Autor formułuje je ostrożnie, wskazując na konieczność dalszych badań w celu potwierdzenia uzyskanych danych. Warto też odnotować, iż w końcowej części Dyskusji mgr B. Dudek przedstawia plan badań własnych jakie chciałby podjąć w przyszłości, aby zweryfikować niektóre z otrzymanych wyników i ich interpretację.

Praca była finansowana z grantu NCN w ramach konkursu Preludium oraz z funduszy otrzymanych przez Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, przeznaczonych na finansowanie badań młodych naukowców. Doktorant uzyskał stypendium współfinansowane z Europejskiego Funduszu Społecznego. Mgr B. Dudek jest współautorem 3 opublikowanych prac i 1 przesłanej do publikacji oraz 13 komunikatów na konferencjach naukowych.

Oprócz uwag przedstawionych wyżej proszę Doktoranta o odniesienie się podczas obrony doktoratu do następujących kwestii:

1. Autor w kilku miejscach nadużywa określonych sformułowań; np. na str. 22 słowo „posiadają” użył 4 razy, inne jego znaczenia znalazłem na str. 37, natomiast na str. 49 napisał, iż formy SR „posiadają jedną jednostkę polisacharydową”. Myślę, że chodziło Doktorantowi o jedną jednostkę powtarzającą się (ang. repeating unit). Jest ich wiele w polisacharydzie O-swoistym form gładkich (S) bakterii.
2. Co Doktorant rozumie pod pojęciem „flageliny” jako czynniki wirulencji (Str. 31).
3. Czy kwas sjałowy oznaczano w LPS (patrz Cel pracy p.1.) czy też w „osadzie komórek bakteryjnych” jak to podano na stronie 61.
4. Str. 90 tabela 5. Czy geny pełnią funkcję związane z wirulencją ? Czy nie należało napisać, iż kodują białka stanowiące czynniki wirulencji ?.

5. Podobnie nieprecyzyjne jest sformułowanie na str. 141 „bardzo długie łańcuchy O swoiste uniemożliwiają trwałe połączenie się MAC z błoną zewnętrzną „. Przecież OPS jest częścią LPS, a ten jest elementem OM. Oczywiście ochrona OM przed działaniem MAC ma miejsce i w niej ważną rolę odgrywa OPS, ale należało to inaczej ująć.
6. Autor zwrócił uwagę na str. 142 na obecność w szczepach opornych na działanie NSL białka PgtE, proteazy o zdolnościach do hydrolizy składowych dopełniacza. Ciekawi mnie, czy może sprawdzono aktywność tego białka wobec komplementu, podczas inkubacji bakterii z NSL. Podobne pytanie nasuwa się w kontekście aktywności innego zidentyfikowanego białka Rck. Jeśli nie podjęto takich analiz, to może warto rozważyć podjęcie takiego zadania badawczego w przyszłości.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, iż rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Dudka została dobrze przygotowana i wykonana, uzyskano ciekawe, nowe dane dotyczące znaczenia składników ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych w oporności na bakteriobójcze działanie surowicy. Doktorant zrealizował postawione zadania, a uwagi przedstawione wyżej nie pomniejszają mojej wysokiej oceny pracy.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Bartłomieja Dudka pt. „Udział lipopolisacharydu i białek błony zewnętrznej w kształtowaniu wrażliwości pałeczek z rodzaju *Salmonella* na bakteriobójcze działanie surowicy” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Reichert