

20-09-2022

I. dz.....zał.....

znak sprawy.....



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, 9.08.2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marcjanny Wimonć pt. „Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella* Enteritidis do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Ugorskiego

Praca dotyczy badań nad patogenezą zakażeń pałeczkami *Salmonella*, szczególnie udziału genu *yidR* w adhezji i inwazji komórek bakterii do nabłonka. Zadanie postawione do rozwiązania jest ważne z kilku powodów, mianowicie funkcja tego genu jak i szeregu innych w wirulencji *Salmonella* jest słabo poznana, pałeczki *Salmonella* są jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych, pochodzenia z żywności, także zakażeń ogólnoustrojowych, człowieka i zwierząt, zoonoz jako chorób odzwierzęcych. Ponadto, *Salmonella* jest patogenem wewnątrzkomórkowym i często są spotykane przypadki bezobjawowego nosicielstwa *Salmonella*, stąd niezwykle istotne są badania które przybliżyłyby także ten aspekt, poznania procesów w komórce gospodarza. Tematyka ta jest kontynuacją badań prowadzonych w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej już od wielu lat, zespołu ekspertów prowadzonego przez Prof. Macieja Ugorskiego z dużym dorobkiem w tej problematyce i wypracowanym warsztatem badawczym. Dlatego podjęty problem jest aktualny, badania mają istotne znaczenie biologiczne. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono wykaz skrotów, spisy rycin i tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów i metod, wyniki i dyskusję, wnioski oraz spis piśmiennictwa. Praca zawiera 112 stron maszynopisu wraz z 25 rysunkami i 1 tabelą oraz cytowanych 100 pozycji piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autorka wprowadza do tematyki, uzasadnia logicznie cel badań, omawia patogenezę zakażeń pałeczkami *Salmonella*, przedstawia główne czynniki wirulencji mające wpływ na zasiedlanie układu pokarmowego przez te bakterie, akcentuje ich lekooporność. Podkreśla specyficzność zakażenia różnych gospodarzy, od wyłącznie jednego do kilku lub więcej gatunków zwierząt i człowieka. Następnie opisuje białko YidR, wskazując na niemięniej istotną rolę genu *YidR* w wewnątrzkomórkowych procesach w tym metabolizmu. Cel

badania autorka przedstawia w formie 5 zadań, mianowicie planuje otrzymanie mutantu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*, porównanie właściwości adhezyjnych i inwazyjnych szczepu wyjściowego i mutantu wobec komórek nabłonkowych, wpływ delecji *yidR* na ekspresję genów *fimA* i *sicA* odpowiedzialnych za adhezję i inwazyjność *S. Enteritidis*, oraz analizy ekspresji białka YidR w warunkach zakażenia i wpływu delecji genu *yidR* na metabolom *S. Enteritidis*.

W części metodycznej autorka wykonała zestawienie używanych materiałów: odczynniki, enzymy, antybiotyki, przeciwciała, bufory, standardy, plazmidy, szczepy bakteryjne, podłoża, linie komórkowe, aparatura. Następnie opisuje metody biologii molekularnej, kilka odmian reakcji PCR, sekwencjonowanie DNA, elektroporację, mikroskopię fluorescencyjną, metody pracy z liniami komórkowymi, omawia test adhezyjny i inwazyjny, metody badań białek, oznaczanie kwasem bitychnoninowym, elektroforezę SDS-PAGE, metody barwienia białka, w żelu, immunobloting, otrzymywanie białka rekombinowanego YidR, otrzymywanie oczyszczonych przeciwciał i na końcu jest przeprowadzona analiza statystyczna. Metody są dobrze opisane, bardzo czytelnie przedstawiono opisy materiałów i metod, przez co rozdział i cała praca, jest logicznym, jednolitym wywodem.

Badania prowadzono z użyciem komórek nabłonkowych jelit człowieka (linii Caco-2), świni (IpecJ2) i kury (Chic-8E11). Najpierw otrzymano mutant szczepu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*, po czym przeprowadzono jego charakterystykę pod kątem morfologii, zdolności agregacyjnych i wzrostu, i wykazano, że mutant ma obniżoną zdolność adhezyjną i inwazyjną względem komórek nabłonka jelitowego człowieka, świni i kury. Mutant rośnie najlepiej na pożywce z kwasem jabłkowym spośród 192 związków jako źródło węgla, co wskazuje na zaangażowanie białka YidR w szlakach metabolicznych. Wyniki sugerują, że gen *yidR* jest pozytywnym regulatorem ekspresji genu *sicA*, wpływając w ten sposób na adhezję i inwazję komórek nabłonka jelitowego przez pałeczki *S. Enteritidis*. Wykazany dwiema metodami regulatorowy wpływ białka YidR na gen *sicA* oznacza udział w inwazyjności poprzez białko SicA, które z kolei wpływa na system sekrecyjny. Autorka wskazuje na udział YidR w regulacji ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji. Jest to także zgodne z założeniem o cytoplazmatycznej lokalizacji białka YidR. Natomiast wykluczono bezpośredni wpływ białka YidR na gen *fimA* i jego funkcję w adhezyjności. Wyniki mają wartość podstawową, referencyjną w zakresie poznawania mechanizmów patogenezy zakażeń *Salmonella*.

W dyskusji autorka odnosi się do danych z piśmiennictwa, właściwie wykorzystanego, podsumowuje uzyskane wyniki, podejmuje wyjaśnienia wyników nieraz trudnych do jednoznacznej oceny. Autorka interpretuje wyniki obniżonej adhezji mutantu z delecją genu

yidR poprzez wpływ na gen *sicA* i defekt w funkcjonowaniu systemu sekrecyjnego T3SS-1. To także wyjaśnia funkcję genu *yidR* w inwazyjności jak i adhezyjności gdyż T3SS-1 bierze udział w tych procesach. Interesujące wyniki odnoszą się do wykazania kwasu jabłkowego jako źródła węgla, stąd nasuwa się pytanie jakie chciałbym zadać doktorantce, czy istnieje lub można zasugerować związek metabolizmu jabłczanu ze zdolnością pałeczek *Salmonella* do wewnątrzkomórkowego przeżycia i namnażania, czego nie obserwujemy u pałeczki *E. coli* wykorzystującej glukonian lub glukuronian. Odpowiedź pozwoliłaby na zaproponowanie celu terapeutycznego lub ukierunkowanie badań w szczególności lekooporności *Salmonella*. Należy podkreślić, że autorka wykorzystwała umiejętnie dostępne narzędzia i bogate wyposażenie laboratoryjne, metodologiczne w swoich badaniach, opierając się na wynikach własnych badań zadaje pytania i proponuje dalsze kierunki poszukiwań.

Uwagi krytyczne są nieliczne, dotyczą strony redakcyjnej i to zaledwie w kilku punktach. Sprawdzenia wymagają podane stężenia antybiotyków, zwłaszcza, w odniesieniu do stosowanych ich ilości na str. 63, także stężenia FBS na str. 57, dalej, rozcieńczenie jednokrotnie, str. 65, gwiazdki w podpisie pod rys. 11 i 12 nie odpowiadają oznaczeniom na rysunku. Podsumowując, należy podkreślić że praca jest wartościowa, dobrze zaplanowana i wykonana. 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 molekularnych mechanizmach odpowiedzialnych za procesy adhezji i inwazji nabłonka jelitowego przez pałeczki *Salmonella* i ich lekooporności. Osiągnięte przez doktorantkę wyniki zasługują na uznanie, gdyż stwarzają podstawy do badań także nad nosicielstwem *Salmonella*, będą podstawą do badań ekspresji białek w tej fazie, wewnątrz komórki gospodarza.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Marcjanny Wimonć 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. 2022 poz. 574). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marcjanny Wimonć do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Prof. dr hab. Andrzej Gamian