

Prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz

Lublin, dn. 03 sierpnia 2022 r

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marcjanny Wimonóć pt. „*Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella Enteritidis* do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego*” wykonanej pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Maciej Ugorskiego oraz promotora pomocniczego dr Rafała Kolendy

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, z dnia 24 maja 2022 roku.

Tematyka przedstawiona przez Panią mgr Marcjanę Wimonóć w niniejszej rozprawie doktorskiej obejmuje kompleksową analizę biologicznej roli genu *yidR* pałeczek *Salmonella Enteritidis* ze szczególnym uwzględnieniem patogenezy zakażeń.

Badania zaprezentowane przez Doktorantkę mają niezwykle aktualny charakter przede wszystkim ze względu na wysoki odsetek zakażeń tym serotypem u ludzi, jak również wciąż nie do końca poznana patogeneza zakażeń, które mogą mieć zarówno charakter uogólniony jak i ograniczony do przewodu pokarmowego. Szeroki i zróżnicowany zakres gospodarzy oraz bogaty panel czynników wirulencji, a także ogromny przekrój różnego rodzaju mechanizmów i przystosowań prezentowanych przez ten drobnoustrój, pomimo wieloletnich badań, nadal wymaga wyjaśnień.

Salmonella Enteritidis jest obok *S. Typhimurium* jednym z dwóch serotypów najczęściej wywołujących salmonellozy u ludzi, stanowiąc około 48% wszystkich serotypów odpowiedzialnych za infekcje w ostatnich latach. Co więcej, stanowi drugą po kamylobakteriozie przyczynę zoonoz w krajach Unii Europejskiej, wywołując około 91 tysięcy infekcji rocznie, co przekłada się nie tylko na zagrożenie zdrowotne ale również straty ekonomiczne, pochłaniające około 3 mln euro. Objawy w zależności od statusu



zdrowotnego gospodarza i wieku mogą być zróżnicowane, począwszy od objawów żołądkowo-jelitowych aż do zakażenia ogólnoustrojowego zagrażającego życiu, dlatego zakażenie pałeczkami *S. Enteritidis* stanowi największe zagrożenie dla dzieci, osób starszych i osób z defektami immunologicznymi. Jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń są produkty pochodzenia zwierzęcego, a ze względu na fakt, że różne gatunki zwierząt mogą być bezobjawowymi nosicielami, określenie źródła infekcji nie zawsze jest łatwe.

Duży przekrój gospodarzy, zróżnicowana gama objawów klinicznych, brak możliwości zastosowania celowanej terapii, a także duże zróżnicowanie odnośnie serotypów w obrębie podgatunków, ukierunkowują badania nad pałeczkami *Salmonella* głównie na szczegółowe poznanie patogenezы zakażeń i kolonizacji przewodu pokarmowego. Dokładne poznanie mechanizmów składających się na te procesy, być może pozwoli na poprawę kontroli nosicielstwa bezobjawowego u zwierząt, co z kolei przełoży się na spadek infekcji zoonotycznych u ludzi. Z tego względu problematyka podjęta przez Doktorantkę w mojej opinii stanowi bardzo cenny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy związanej z kolejnym potencjalnym czynnikiem modulującym proces infekcji na tle *S. Enteritidis*.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa posiada formę monografii i została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla tego typu opracowań. Rozprawa doktorska liczy 112 stron i została podzielona na siedem rozdziałów zatytułowanych w kolejności jako: wstęp (25 stron), cel pracy (1 strona), materiał i metody (36 stron), wyniki (24 strony) dyskusja (7 stron), podsumowana trzema zwięzłymi wnioskami, oraz piśmiennictwo obejmujące łącznie 100 pozycji literaturowych. Praca została również opatrzona streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim. Doktorantka załączyła także wykaz skrótów, którymi posługiwała się w niniejszej pracy, jak również wykaz tabel i kilkudziesięciu rycin ilustrujących w głównej mierze uzyskane wyniki.

Ocena szczegółowa

Wstęp został podzielony na cztery podrozdziały, z których każdy kolejny wprowadza czytelnika na głębszy poziom analizowanego zagadnienia. Rozdział ten otwiera wprowadzenie przedstawiające krótką charakterystykę pałeczek *Salmonella* i ich znaczenie epidemiologiczne z uwzględnieniem badanego serotypu. Następnie Doktorantka dość

płynnie przechodzi do mechanizmów patogenezy zakażeń na tle *Salmonella*, który ilustruje odpowiednim schematem, po czym krótko charakteryzuje istotne czynniki wirulencji, finalnie skupiając się na dotychczas znanych doniesieniach dotyczących znaczenia białka YidR u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Taka forma wstępu daje jasno i logicznie zaprojektowane tło do badań przeprowadzonych przez Panią mgr Marcjanę Wimonć.

Należy podkreślić, iż Doktorantka bardzo przystępnie ukierunkowała wprowadzenie do najpierw zaplanowanych, a następnie przeprowadzonych analiz, powoli doprowadzając do uzasadnienia celu pracy.

Uzasadnienie i cel pracy zostały przedstawione w sposób jasny i nie budzący wątpliwości. Doktorantka wyodrębniła pięć celów szczegółowych, które miały doprowadzić do wyjaśnienia roli genu *yidR* w biologii pałeczek *Salmonella*.

Warto podkreślić, iż Doktorantka założyła przeprowadzenie całej analizy, łącznie z otrzymaniem mutantu *S. Enteritidis* (delecja genu *yidR*) i jego charakterystyką jak również odniesieniem uzyskanych wyników badań do szczepu dzikiego tego samego gatunku

Część eksperymentalna została dobrze zaprojektowana i jasno przedstawiona. Rozdział „Materiały i metody” składa się z kilku podrozdziałów przedstawiających szczegółowy opis wykorzystanej aparatury, odczynników, procedur oraz użytych materiałów biologicznych, w tym linii komórkowych, wektorów plazmidowych i szczepów. Doktorantka metodycznie i bardzo szczegółowo przedstawiła również zastosowane protokoły oraz ich celowość na każdym etapie eksperymentu. Z dużym uznaniem odnoszę się do tak przekrojowo skonstruowanej i zastosowanej metodyki, obejmującej umiejętność pracy nie tylko z materiałem genetycznym ale również hodowlami bakteryjnymi i liniami komórkowymi. Każda z tych dziedzin wymaga dużej wiedzy i umiejętności, a ich konstruktywne połączenie dało możliwość uzyskania ogromnej liczby danych, które w konsekwencji pozwoliły na wielopłaszczyznową analizę postawionego problemu badawczego.

W mojej opinii jedynym niedosytem był bardzo skąpy opis szczepu dzikiego *S. Enteritidis*, wykorzystanego w badaniach. Być może warto byłoby rozszerzyć informację odnośnie źródła pochodzenia ww. szczepu (gospodarz) oraz dlaczego do badań wytypowany został właśnie ten szczep.

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna się od prezentacji wyników opisujących proces otrzymania mutantu z delecją genu *yidR*. Każdy etap (homologiczna rekombinacja, transformacja) jest również opatrzony opisem odpowiednich elementów kontrolnych determinujących finalne

otrzymanie pożądanego mutantu P125109 Δ YidR. Podobnie jasno i klarownie przedstawione są pozostałe wyniki, tj. charakterystyka szczepu pod względem morfologii i zdolności do agregacji, ocena tempa wzrostu w porównaniu ze szczepem dzikim oraz zdolność do adhezji i inwazyjność w odniesieniu do trzech typów komórek wywodzących się z nabłonka układu pokarmowego człowieka, świni i kury. Ta część wyników została również opatrzona czterema rycinami. W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo wyniki dotyczące ekspresji genów kodujących wybrane białka fimbrii typu 1 i T3SS-1 w aspekcie analizy porównawczej mutantu oraz szczepu dzikiego. Pani mgr Marcjanna Wimoné wytypowała do tego celu dwa geny (*fimA* i *sicA*). W mojej opinii bardzo dobrym rozwiązaniem zastosowanym w opisie przez Doktorantkę było krótkie wprowadzenie do tego podrozdziału, przedstawiające zasadność doboru powyższych genów oraz ich znaczenie, a także skrócony opis całej procedury, której efekty zostały w pełni rozwinięte w dalszej części podrozdziału. Ta część również została opatrzona siedmioma rycinami i schematami obrazującymi otrzymane wyniki na każdym etapie eksperymentu.

Wyniki dotyczące kolejnego etapu badań obejmującego uzyskanie rekombinowanego białka Yidr oraz jego ekspresji w warunkach hodowli optymalnych dla ekspresji genów *sicA* i *fimA*, również zostały opisane bardzo precyzyjnie i zilustrowane adekwatnymi rycinami i schematami. Na tym etapie również należy podkreślić dużą czytelność opisu i dbałość o jakość załączonych zdjęć, które jednoznacznie potwierdzają uzyskane wyniki.

W ostatnim etapie badań Doktorantka przeprowadziła charakterystykę metaboliczną mutantu P125109 Δ YidR w odniesieniu do szczepu dzikiego, w aspekcie wykorzystania przez oba szczepy różnych źródeł węgla. Stosując Mikromacierze Fenotypowe PM1 i PM2A Doktorantka wykazała, że szczep P125109 Δ YidR różni się w odniesieniu do szczepu dzikiego metabolizmem D-trehalozy, sacharozy, kwasu jabłkowego i 2-deoksy-D-rybozy. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki zostały dodatkowo ocenione w teście hodowlanym w pożywce z dodatkiem ww. substratów jako jedyne źródła węgla. Doktorantka w tym badaniu potwierdziła, że jedynie w przypadku 5 mM kwasu jabłkowego, wyniki uzyskane za pomocą Mikromacierzy Fenotypowych są zgodne. W tym miejscu pojawiła się pewna niejasność w odniesieniu do procedury przedstawionej w rozdziale 3.3.3, w którym tę część Doktorantka opisuje w odniesieniu do hodowli w pożywce M9 ale w obecności różnych stężeń glukozy lub kwasu jabłkowego. Czy badanie hodowlane było również prowadzone w obecności D-trehalozy, sacharozy i 2-deoksy-D-rybozy w pożywce?

Uzyskane wyniki stały się podstawą do zwięzłej dyskusji. Doktorantka bardzo konkretnie odniosła się do uzyskanych wyników, zarazem bardzo ostrożnie konfrontując je z dostępną literaturą. Uważam, że jest to bardzo dobra cecha. Dobrym tego przykładem jest ocena udziału genu *yidR* w procesie adhezji i inwazji komórek nabłonka, który Doktorantka oceniła jako statystycznie niższy ale nie nazbyt drastyczny. Doktorantka równie umiejętnie poddała analizie wyniki dotyczące wpływu białka YidR na gen *sicA* i *fimA* wykazując, iż w przypadku tego pierwszego, białko YidR ma udział w regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji, natomiast w przypadku drugiego genu Doktorantka wykazała brak udziału w regulacji jego ekspresji, co wskazuje na wpływ genu *yidR* na adhezję ale nie poprzez wpływ na wytwarzanie fimbrii typu 1. Również w przypadku analizy aktywności metabolicznej potencjalnie regulowanej przez produkt ekspresji genu *yidR* Doktorantka potwierdziła jego udział w metabolizmie kwasu jabłkowego, niemniej w konfrontacji z *E. coli*, bakterią, u której również potwierdzono wpływ genu *yidR* na metabolizm, wykazała, iż aktywność ta nie jest związana z jednym metabolitem i w zależności od gatunku drobnoustroju może dotyczyć zupełnie innych związków, wykorzystywanych przez bakterie jako źródło węgla. Dyskusja została podsumowana trzema zwięzłymi wnioskami. Ponownie muszę odnieść się z dużym uznaniem do bardzo ostrożnego i wyważonego sformułowania wniosków. Pomimo szeregu bardzo szeroko zakrojonych i wielopoziomowych badań, we wnioskach zostały zawarte tylko i wyłącznie istotne i potwierdzone obserwacje, które stanowią doskonały punkt wyjściowy do dalszych badań mających na celu poszerzenie wiedzy w zakresie mechanizmów patogenezy. Ponadto tak sformułowane wnioski w pełni odzwierciedlają znaczenie poznawcze przeprowadzonych badań oraz potwierdzają zdolność do samodzielnej analizy i prawidłowej oceny uzyskanych wyników.

Mimo bardzo dużej staranności włożonej przez Doktorantkę przy przygotowaniu rozprawy, nie ustrzegła się. Ona kilku drobnych błędów, które z obowiązku recenzenta powinnam wskazać:

-sugeruję w opracowaniu polskojęzycznym stosować odpowiedniki polskojęzyczne takich sformułowań jak np. *nock-out* czy *chaperon*

- str. 17: sugeruję doprecyzować i uwzględnić również podgatunki wyróżniane w obrębie *S. enterica*; tutaj dodatkowym elementem różnicującym zgodnie z zacytowanym schematem Kauffmann-White-Le Minor (również sugeruję korektę sposobu zapisu) jest również ocena wybranych właściwości biochemicznych, ponadto w przypadku badań opartych o

serotypizację również obecność lub braki antygeny otoczkowego Vi. Być może obecny zapis jest skrótem myślowym zastosowanym przez Doktorantkę.

str. 18: Zdanie wskazujące na związek pomiędzy występowaniem MDR a zjadliwością jest również zbyt dużym skrótem myślowym. Sugeruję przy przygotowywaniu materiału do publikacji rozszerzyć nieco kontekst związku pomiędzy zjadliwością i opornością (geny na wspólnym MGE?)

str 21: sugeruję w zdaniu: „Szczepy *Salmonella* wnikają do komórek...” zastąpić: „Pałeczki *Salmonella* wnikają do komórek....”

Str 51 i inne: w mojej opinii znacznie zwięźszyć jest sformułowanie: „*Następnie do kuwet dodawano...*” zamiast „*Teraz do kuwet dodawano...*”, podobnie jak na str 59: zamiast „*...które hodowano w nieobecności bakterii.*” można zastąpić: „*...które hodowano bez obecności bakterii.*”

Wszystkie te drobne niedociągnięcia mają jedynie charakter porządkowy i z pewnością nie wpływają na bardzo wysoką ocenę całokształtu rozprawy.

W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, iż recenzowana przez mnie rozprawa doktorska Pani mgr Marcjanny Wimoné pt. „*Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella Enteritidis* do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego*”, odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 1 lipca z 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn zm) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Marcjanny Wimoné do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe i poznawcze uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

