



UMCS

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 04.03.2025
L.dz. 67

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Genetyki i Mikrobiologii

Lublin, 24 luty 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Pauli Czyszczoń zatytułowanej
„Charakterystyka pęcherzyków błony zewnętrznej *Yersinia enterocolitica* O:3
i ich oddziaływanie z ludzkim układem dopełniacza”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz. Badania były prowadzone i finansowane w ramach projektu badawczego Opus 16 2018/31/B/NZ603514 „Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza”. Z poprzedzających treść rozprawy podziękowań, złożonych osobom pomagającym w przeprowadzeniu wielu etapów badań, można się zorientować jak wielowątkowe zadanie zostało postawione przed Doktorantką. Obiektem badań były pęcherzyki błonowe izolowane z płynu po hodowli bakterii *Yersinia enterocolitica* O:3. *Y. enterocolitica* O:3 to chorobotwórczy dla ludzi szczep bakterii powodujący najczęściej infekcje układu pokarmowego (jersiniozy). W zależności od kondycji gospodarza, obraz kliniczny zakażenia jest bardzo różny. Bakterie zwykle powodują stan zapalny jelit, ale w szczególnych okolicznościach przedostając się do płynów ustrojowych mogą wywołać posocznice, co wiąże się z bezpośrednim zagrożeniem życia osoby chorej. Oprócz klasycznych czynników wirulencji charakterystycznych dla tej grupy bakterii (takich jak LPS, enterobakteryjny wspólny antygen (ECA), białka Yop wraz z trzecim system sekrecji) ostatnio zwraca się uwagę na rolę pęcherzyków błony zewnętrznej (OMV) w rozwoju reakcji zapalnych.

Przedłożona do recenzji praca doktorska liczy łącznie 227 stron, zawiera 41 rycin, 20 tabel oraz jeden załącznik. Rozprawa ma układ klasyczny i zarazem typowy dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym. Została napisana w języku polskim. Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim.

Tak jak każdy artykuł naukowy tak i tę rozprawę poprzedza streszczenie (wersja polsko- i angielskojęzyczna). Zamieszczone streszczenia są jednak zbyt obszerne. Liczą one po dwie i pół strony tekstu, z czego pierwsze akapity (prawie cała strona tekstu) są ogólnym wprowadzeniem



literaturowym w problematykę doktoratu. Dalej, w sposób skrótowy, przedstawione zostały kolejne etapy badań. Ta część jest właściwym streszczeniem. W **Streszczeniu** najbardziej zdziwiło mnie zdanie wskazujące, że „Kluczowym etapem pracy doktorskiej był wybór i optymalizacja procedur izolacji OMV”. Z punktu widzenia Recenzenta nie ulega wątpliwości, że kluczowe etapy tej pracy doktorskiej powinny koncentrować się wokół doświadczeń dokumentujących cel pracy zaprezentowany w jej tytule i rozwinięty w rozdziale zatytułowanym **Cel Pracy**.

Kolejnym rozdziałem jest **Wykaz Skrótów**. Wykaz zapewne obejmuje wszystkie skróty użyte w pracy doktorskiej, a nawet z pewnym nadmiarem, gdyż zawiera również wyjaśnienia skrótów powszechnie znanych chemikom czy biologom. Należą do nich NMR, EDTA, PBS, SD czy IgG. Wśród wyjaśnień skrótów znajdują się pewne nieścisłości. Do takich można zaliczyć np. rozwinięcie skrótu Yop jako „białka błony zewnętrznej *Yersinia*”, podczas gdy opisuje on białka efektorowe *Yersinia* kodowane na plazmidzie wirulencji *pYV*, które są wprowadzane od komórek gospodarza za pomocą trzeciego systemu sekrecji (T3SS). Nadmieniam też, że skrót PCP używany jest w kontekście specyficznej ekstrakcji, a więc należałoby wyjaśnić tutaj nie sam skrót „PCP” lecz „ekstrakcja PCP”.

Obszerny **Wstęp** jest dobrze opracowaną częścią teoretyczną doktoratu, w której doktorantka omawia zagadnienia związane z przedmiotem rozprawy. W oparciu o właściwie dobrane artykuły źródłowe i przeglądowe (doktorantka cytuje 352 publikacje w tym kilka odnośników do stron internetowych) Pani mgr Paula Czyszczon w sposób uporządkowany przedstawia aktualny stan wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Yersinia* wskazując na ich pozycję taksonomiczną i czynniki wirulencji produkowane przez szczepy patogenne. Szczególnie wiele uwagi poświęca: lipopolisacharydom, wspólnemu enterobakteryjnemu antygenowi, egzopolisacharydowi oraz białkowym antygenom powierzchniowym produkowanym przez szczepy *Y. enterocolitica*. Szczególnie znaczenie (ze względu na podjęty temat badań) mają w tej części rozprawy informacje dotyczące wytwarzania przez bakterie pęcherzyków błonowych, w tym pęcherzyków *Yersinia*. Doktorantka zaznacza czytelnika z chorobotwórczością i epidemiologią zakażeń pałeczkami *Y. enterocolitica*. W ten sposób Doktorantka przechodzi od patogenu do opisu reakcji obronnych organizmu zakażanego (człowieka) i roli dopełniacza w tych reakcjach. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka błędów, które zauważyłem w tej części rozprawy. We wstępnych zdaniach wprowadzających w opis LPS *Yersinia* (str. 20) pojawiło się niefortunne określenie „wykrzepianie dożylnie” zamiast „wykrzepianie wewnątrznaczyniowe”. Na kolejnej stronie we wzorach powtarzających się podjednostek LPS (serotypy O:8 i O:9) konfiguracja absolutna reszt cukrów powinna być zapisana przy użyciu specjalnego kroju czcionki (kapitaliki), a nie wielką literą. Doktorantka używa niepoprawnie określeń: pierwszorzędowe i drugorzędowe kwasy tłuszczowe (str. 23 i dalej). Kwasy tłuszczowe mogą być jedynie podstawione jako pierwszorzędowe lub jako drugorzędowe, itd. Ale nie

mogą być np. kwasami pierwszorzędowymi czy drugorzędowymi *per se*. Ponadto, należy się zastanowić, czy mówiąc o biofilmie można użyć określenia „błona biologiczna” (str. 29). Równie niefortunne wydaje się być określenie, że „...niektóre szczepy *Y. enterocolitica* są zdolne do produkcji jersiniobaktyny, sideroforu wiążącego żelazo z wyższym powinowactwem niż białka gospodarza” (str. 31), czy też „...jersiniobaktyny, wiążącej żelazo również w stanie jego niedoborów” (str. 18) oraz zwrot „...*Y. enterocolitica* (...) jest zdolna do kontaminowania próbek krwi przeznaczonych do transfuzji”. Końcowe fragmenty tego rozdziału, poświęcone wykorzystaniu OMV jako szczepionki chroniącej przed zakażeniem *Acinetobacter baumani* są napisane tak niejasno, że nie zawsze wiadomo czy relacjonowane doświadczenia były prowadzone na modelu króliczym czy mysim.

Podsumowując tę część rozprawy, mogę stwierdzić, że Doktorantka dobrze wywiązała się z zadania zapoznania czytelnika z obecnym stanem wiedzy odnośnie tematyki poruszanej w doktoracie. Prezentowane treści są podane w sposób uporządkowany, przystępny i logiczny. Nieliczne uchybienia odnotowane powyżej nie mają istotnego wpływu na moją pozytywną ocenę treści **Wstępu**.

Rozdział czwarty pt. „**Cel Pracy**” jest dość krótki i zwięzły. Na dwóch stronach tekstu Doktorantka przedstawia w jasny sposób jakie zadania zostały przed nią postawione i w jaki sposób zamierzała je zrealizować. Doktorantka deklaruje, że jej pierwsze i jednocześnie „nadrzędne” zadanie jest tożsame z tytułem pracy doktorskiej, a obejmuje ono: i) charakterystykę OMV wytwarzanych przez cztery różne chemotypy bakterii oraz ii) weryfikację założenia, czy OMV YeO3 mogą pełnić rolę aktywatora reakcji zapalnej i czy mogą pełnić rolę tarczy chroniącej bakterie *Y. enterocolitica* O:3 bytujące w zakażonym organizmie człowieka przed działaniem układem dopełniacza. Elementem o jaki został dodatkowo poszerzony zakres pracy doktorskiej jest badanie dystrybucji różnych OMV YeO3 w organizmie myszy. Podobnie jak w **Streszczeniu**, pierwsze akapity **Celu Pracy** są ogólnym wprowadzeniem i bez szkody dla całości rozdziału mogłyby zostać usunięte.

W kolejnym rozdziale pracy, zatytułowanym **Materiały i Metody**, Pani mgr Paula Czyszczoń szczegółowo opisuje wykorzystane w pracy materiały oraz zastosowane metody badawcze. W następujących po sobie podrozdziałach Doktorantka przedstawia/opisuje kolejne doświadczenia jakie były prowadzone w trakcie wykonywania pracy doktorskiej, w wielu przypadkach zaznaczając rzetelnie swój udział w tych pracach. Zamieszczone opisy przeprowadzonych analiz są na tyle dokładne, że bez większych problemów można je powtórzyć w innym laboratorium. Zaprezentowany w tej pracy doktorskiej szczegółowy opis przeprowadzonych eksperymentów to klasyczne i bardzo cenne podejście do pisania rozpraw doktorskich, które jest bardzo przydatne (gdyż jest bezpośrednim źródłem informacji metodycznych) dla kolejnych studentów Szkoły Doktorskiej podejmujących pracę o podobnej tematyce. Aby ten rozdział mógł stanowić dla innych badaczy dobre źródło wiedzy, należy z niego wyeliminować wiele drobnych błędów, nieścisłości i określeń żargonowych. Nie będę w tej

recenzji wszystkich kolejno przytaczał. Wskażę jedynie kilka uchybień. Już na wstępie Doktorantka pisze, że dysponuje trzema szczepami *Y. enterocolitica*, a zaraz poniżej umieszcza w tabeli opis czterech szczepów. Doktorantka zamiennie używa określeń: „jony pozytywne” i „jony dodatnie” oraz „jony negatywne” i „jony ujemne”. Należy zauważyć, że w metodzie identyfikacji bakterii z zastosowaniem techniki MALDI nie przeprowadza się ekstrakcji białek rybosomalnych, jak twierdzi Doktorantka. Nie jest mi również znana mieszanina o składzie „ACN:miliQ”. Rejestracji widm NMR nie dokonuje się za pomocą „spektroskopu”. Ponadto, w doświadczeniach nie „detekcjonuje” się lecz prowadzi się detekcję albo wykrywa się coś stosując metodę..., itd. Błędna jest nazwa „sól amonowa 2-keto-3-deoksyoktonianu”. Kumulacja błędów jest widoczna w podrozdziale 5.15. „Elektroforeza SDS-PAGE”, gdzie doktorantka napisała „Rozdział elektroforetyczny prowadzono (...) przy natężeniu 30mA na płytkę, napięcie wynosiło 300W, natężenie 200V...”. Zaraz po tym podany jest skład utrwalacza: „45% metanol, 10% kwas octowy” i na tym koniec. Pytanie; co z pozostałymi 45 procentami roztworu. I zaraz poniżej, odnośnie barwienia metodą Coomassie, pojawia się niezrozumiałe oznaczenie „0,1% w/o”. Takich drobiazków jest dużo mniej w opisie doświadczeń o charakterze immunologicznym.

Najważniejsze informacje, będące podstawą oceny pracy doktorskiej, zawarte są w rozdziale opatrzonym tytułem **Wyniki**. Wstępem do badań porównawczych bakterii i wytwarzanych przez nie OMV była weryfikacja struktur powierzchniowych (zaliczanych do głównych antygenów) wcześniej opisanych dla *Y. enterocolitica* O:3. Już to zadanie wymaga dużego nakładu pracy, ponieważ pod uwagę zostały wzięte aż cztery chemotypy bakterii, a wiadomo, że ich struktura (a w szczególności struktura lipidów A) jest modyfikowana przez bakterie w odpowiedzi na zmianę temperatury otoczenia. Biorąc to pod uwagę, preparaty LPS/lipid A otrzymywano z hodowli bakterii prowadzonych w trzech temperaturach: 37°C, 22°C oraz 4°C. Doktorantka nie pominęła w badaniach wspólnego enterobakteryjnego antygeny (ECA) oraz sprawdziła, że *Y. enterocolitica* O:3 chemotyp S wytwarza EPS będący spoiwem (macierzą) biofilmu wytwarzanego przez jersinie. Niewielkie ilości produkowanego przez *Y. enterocolitica* O:3 chemotyp S polisacharydu o charakterze kapsuły wręcz „wyciśnięte” z biofilmu wystarczyły Doktorantce żeby określić (w dosyć nietypowy sposób) jego strukturę i zaliczyć go do mannanów. Kolejny rozdział **Wyników** prezentuje rezultaty prac nad optymalizacją procedur otrzymywania i oczyszczania OMV YeO3. Różne podejścia do tego zagadnienia doprowadziły do pojawienia się w pracy doktorskiej mgr Pauli Czyszczoń wielu frakcji pęcherzyków (oznaczonych: OMV_I, OMV_{II}, OMV_{III}A, OMV_{III}B). Z jednej strony, wielość frakcji OMV utrudnia śledzenie dalszego opisu badań, jednak z drugiej strony pozwala na wgląd jaki wpływ na ostateczny wynik badań ma zastosowana procedura izolacji OMV. Ostatecznie, do większości

analiz wykorzystano pęcherzyki oczyszczone metodą ultrafiltracji przepływowej (frakcja OMV_{III A}) lub te doczyszczone przez ultrawierowanie w gradiencie gęstości jodiksanolu (frakcja OMV_{III B}). Stopień czystości ma szczególne znaczenie przy badaniach immunologicznych. Charakterystyka pęcherzyków i ich wytwarzania to kolejne wyzwanie ze względu na wielość preparatów (i chemotypy, i temperatury hodowli) oraz wielość parametrów do oznaczenia (średnice i ich rozkład, zawartość białka, zawartość LPS oraz charakterystyka antygenów obecnych w membranie pęcherzyków – to zadanie było najbardziej pracochłonne). Dopiero po tak rozległej charakterystyce preparatów Doktorantka przystąpiła do badań immunologicznych. Realizowała je systematycznie począwszy od określenia wpływu OMV_{III B} na ekspresję genów interleukin prozapalnych, ocenę wrażliwości szczepów *Y. enterocolitica* O:3 na bakteriobójczą aktywność surowicy (NHS), ocenę zdolności OMV do hamowania tej aktywności, żeby w końcu przejść do określenia zdolności OMV do aktywacji układu dopełniacza. Doktorantka dowiodła możliwości aktywacji dopełniacza przez OMV YeO3 każdą z trzech możliwych dróg ze szczególnym wskazaniem na szlak lektynowy i możliwość jego aktywacji przez polimer termostabilny, oporny na działanie proteazy i DNA-zy, który pokrywa powierzchnię pęcherzyków (prawdopodobnie jest to opisany wcześniej mannan). Ostatni opisany pakiet doświadczeń dotyczył określenia do jakich tkanek przemieszczają się podane dootrzewnowo OMV YeO3. Wyliczam tutaj wszystkie podjęte przez Doktorantkę działania, jedynie w celu wskazania na wielowątkowość przeprowadzonych badań i jednocześnie na wysiłek jaki został włożony przez Doktorantkę, Panią Promotor i współpracowników (wskazanych w podziękowaniach) w realizację tego zadania.

W tym rozdziale można znaleźć wiele drobnych błędów i uchybień stylistycznych. Zwracam uwagę na niektóre z nich i jednocześnie kieruję kilka pytań do Doktorantki:

Str. 96 Ryc. 15a; Wzory strukturalne LAII-P oraz LAII są identyczne.

Str. 97; „Hodowlę bakteryjną prowadzono 8 dni”, zaś w Materiałach i Metodach czas uległ skróceniu do 6 dni.

Str. 107; Brakuje tutaj (albo w rozdziale Materiały i Metody) opisu, na jakiej zasadzie działa zestaw ExoBacteria OMV Isolation Kit. Podobna uwaga dotyczy metody pozyskiwania EPS. W przypadku tego ostatniego są podane tylko odnośniki do odpowiednich publikacji.

Na stronie 116 pojawia się wielokrotnie nietypowy zapis odchyleń standardowych.

Str. 111; dwukrotnie jest mowa o „białku OmpC/F” – czy nie są to dwa podobne białka OmpC i OmpF (tzw. „duża” i „mała” poryna).

Str. 121i 122; Tabela 17; Czy tak duże różnice w wydajności OMV (w przeliczeniu na białko) nie świadczą o braku optymalizacji metody?

Str. 128 i 129; Ryc. 24 i 25 Na wszystkich chromatogramach przedstawiających rozdziały materiału uzyskanego po kwaśnej hydrolizie OMV pojawiają się piki tuż przed 20 min. Jakie substancje one reprezentują?

Str. 130; Dlaczego na widmie NMR OMV S 37°C sygnał H4 jest bardzo wysoki w porównaniu do np. sygnałów H1 i H3?

Str. 131 i w innych miejscach rozprawy; Zapisy $[M+H+Na]^+$, $[M-H_2O+H+Na]^+$ są niepoprawne. Przy założeniu (zwyczajowym), że M to masa cząsteczkowa związku, a H i Na to proton i jon sodowy, przedstawiony jon pseudomolekularny powinien być dwudodatni.

Str 132; Jak acetonitryl (rozpuszczalnik) może być zanieczyszczeniem w technice MALDI? Po nakropieniu acetonitrylu na płytkę MALDI, acetonitryl odparowuje i do źródła jonów trafia już sucha płytka.

Str. 133, Ryc. 28; Nie można napisać „kwas tetradekanowy nasycony” i „kwas tetradekanowy nienasycony”. Sama nazwa „kwas tetradekanowy” wskazuje, że jest to kwas nasycony.

Str. 147, Ryc. 34 b); Oś pozioma (X) ma identyczne oznaczenia z oznaczeniami na panelu obok wykresu (po prawej stronie wykresu)

Str. 154 i Ryc 38; Skrót „DiD” nie został umieszczony w wykazie skrótów.

Str. 160, Ryc. 41; Rycina jest nieczytelna, a pod nią pozostało prawie pół strony pustej. Błąd w edycji manuskryptu.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka omawia oryginalne wyniki uzyskane w trakcie realizacji grantu NCN OPUS 16 „Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza”, w ramach którego powstała przedłożona do oceny praca doktorska. Dyskusja została przeprowadzona w sposób spójny i systematyczny, a kolejność omawianych zagadnień jest skorelowana z kolejnością opisanych eksperymentów. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej, dotyczącej badań nad pęcherzykami bakteryjnymi i potrafiła rzeczowo i krytycznie porównać dane literaturowe z wynikami swoich badań. Uważam, że dyskusja jest rozdziałem najlepiej napisanym i dopracowanym w całym doktoracie. Mimo takiego stwierdzenia proszę, żeby doktorantka przeredagowała i przedstawiła (może w trakcie publicznej obrony) w sposób możliwie prosty wniosek czwarty (zaczynający się u dołu strony 165), a dotyczący charakterystyki pęcherzyków. W zaprezentowanej formie ten wniosek jest niezrozumiały. Jednocześnie wniosek pierwszy, odnoszący się do weryfikacji struktur chemotypu Re i Rd1 (strona 162), według mojej opinii jest nie do końca uprawniony. Postulowanie istnienia struktur typu Kdo₂-Kdo₆, które przetrwały warunki hydrolizy kwasem octowym i wykrywane są jedynie metodą ESI-MS jest przedsięwzięciem bardzo ryzykownym. Myślę, że dużo prostszym wytłumaczeniem byłoby

przyjęcie założenia tworzenia się klastrów cząsteczek o wzorze Kdo_x gdzie x przyjmuje wartości ≥ 2 (wyniki w tabelach od 5 do 8). Dobrym przykładem tworzenia się klastrów jest wykorzystanie fosforu (P) lub jodku cezu (CsI) do kalibracji spektrometrów mas. Odmiennie (zgodnie z wnioskami Doktorantki) należy podchodzić do liczby reszt heptozowych obecnych w chemotypie Rd1. Kolejny wniosek (poniżej, wniosek nr 2) w tej części dyskusji jest jedynym pozostawionym bez wyjaśnień w całym rozdziale.

Wnioski końcowe

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, jakim było: i) charakterystyka fizykochemiczna pęcherzyków błony zewnętrznej wytwarzanych w różnych warunkach termicznych przez cztery chemotypy *Y. enterocolitica* O:3, ii) charakterystyka porównawcza głównych antygenów powierzchniowych (LPS/LOS) syntetyzowanych przez *Y. enterocolitica* O:3 z pulą antygenów obecnych w membranach pęcherzyków błonowych wytwarzanych przez te bakterie, iii) badanie oddziaływania otrzymanych pęcherzyków z ludzkim układem dopełniacza oraz iv) badanie *in vivo* dystrybucji pęcherzyków błonowych w tkankach myszy. Wykonana i napisana przez Panią mgr Paulę Czyszczoń praca doktorska wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki, szczególnie w zakresie immunologicznej odpowiedzi na zakażenia, oraz umiejętność prowadzenia badań naukowych samodzielnie i w kooperacji z innymi naukowcami. Poczynione przeze mnie uwagi krytyczne odnoszą się głównie do formy prezentacji wyników i nie umniejszają wartości naukowej przedłożonej rozprawy. Mam nadzieję, że wyniki zawarte w doktoracie Pani mgr Pauli Czyszczoń zostaną w niedługim czasie opublikowane i w ten sposób dostępne dla szerokiego grona naukowców.

Warto zauważyć, że mgr Paula Czyszczoń jak na tak młodą osobę może pochwalić się dużym doświadczeniem zawodowym, gdyż jako wykonawca uczestniczyła w realizacji aż sześciu projektów badawczych. Uzyskane wyniki prezentowała na trzech konferencjach międzynarodowych i jest współautorką jednej publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że cel pracy doktorskiej Pani mgr Pauli Czyszczoń został osiągnięty, a przedłożona do oceny **rozprawa spełnia wymagania stawiane ustawowo i zwyczajowo pracom doktorskim, w tym warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.)**. Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej IITD PAN we Wrocławiu wniosek o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Pauli Czyszczoń do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz o dopuszczenie Jej do publicznej obrony.


Prof. dr hab. Adam Choma