

Lublin, 07.09.2023

dr hab. Magdalena Staniszevska prof. KUL
Instytut Nauk o Zdrowiu
Wydział Medyczny
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1 J, 20-708 Lublin
tel. 81-454-5621
email: magdalena.staniszevska@kul.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Roszkowiak

pt. „Pęcherzyki błony zewnętrznej *Moraxella catarrhalis* jako czynniki wirulencji i immunomodulacji”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Roszkowiak została wykonana pod kierunkiem dr hab. Darii Augustyniak w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Podjęte przez doktorantkę badania dotyczą wyjaśnienia znaczenia pęcherzyków błony zewnętrznej (OMVs) bakterii *Moraxella catarrhalis* w patogenezie zakażeń układu oddechowego. Głównym przedmiotem pracy była charakterystyka pęcherzyków pod względem ich budowy i oddziaływania z bakteriami współtowarzyszącymi oraz poznanie wpływu na odpowiedź ze strony układu odpornościowego gospodarza na struktury, będące źródłem istotnych czynników wirulencji.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani Justyny Roszkowiak ma typowy dla prac eksperymentalnych układ. Zorganizowana jest na poszczególne rozdziały, które zawierają odpowiednio umieszczone treści. Praca jest obszerna i obejmuje 199 stron z czego 1/3 stanowi opis uzyskanych wyników, wskazując na szeroki zakres wykonanych prac eksperymentalnych. We wstępie opisano kontekst problemu badawczego, w klarowny sposób wyjaśniając istotne elementy przeciwbakteryjnej odpowiedzi immunologicznej w drogach oddechowych, właściwości bakterii *Moraxella catarrhalis*, rolę patogenu w zakażeniach dróg oddechowych oraz udział czynników wirulencji w patogenezie tych zakażeń. Następnie przedstawiono typowe mechanizmy odpowiedzi przeciwbakteryjnej gospodarza, szczególnie podczas zakażenia *M.*

catarrhalis. W końcu opisano pochodzenie i budowę pęcherzyków błony zewnętrznej, jako struktur bakteryjnych biorących udział w sekrecji czynników wirulencji oraz oddziałujących z mikroflorą środowiska, które zasiedlają. Bardzo ciekawym rozdziałem jest zbiór informacji na temat udziału pęcherzyków OMVs w wydzielaniu różnorodnych substancji bakteryjnych oraz immunomodulacji odpowiedzi ze strony układu odpornościowego gospodarza. Treść zawarta we wstępie w sposób wyczerpujący pozwala na zapoznanie się z kontekstem badań i świadczy o znajomości tematyki przez doktorantkę.

W kolejnym rozdziale przedstawiony jest cel podejmowanych badań i założone hipotezy, których słuszność jest ustalana w dalszej części pracy na drodze eksperymentalnej. Celem pracy jest charakterystyka pęcherzyków OMV bakterii *M. catarrhalis*, poznanie ich roli w dystrybucji w organizmie gospodarza czynników wirulencji, wpływu na odpowiedź ze strony układu odpornościowego, w tym podczas infekcji wielobakteryjnej.

W rozdziale Materiały i metody szczegółowo opisano używane techniki, podając badane szczepy bakteryjne, komórki eukariotyczne, metody ich hodowli oraz wykonane eksperymenty, wskazując źródła materiałów, stężenia i sposób przygotowania wykorzystanych roztworów, a także inne istotne do powtórzenia eksperymentów szczegóły. Dodatkowo, sposób wykonania wielu eksperymentów zilustrowany jest w formie schematów, znacznie ułatwiających zrozumienie układu eksperymentalnego. Tak elegancko przygotowany opis eksperymentów zaburzają małe „potknięcia” jak podawanie prędkości obrotów wirowania w mało-informatywnych jednostkach - ilości obrotów na minutę (rpm) zamiast przyspieszenia g, czy niefortunnie zastosowany skrót „pF” oznaczający płyn fizjologiczny, który błędnie można odczytać jako nieokreślony parametr przypominający „pH”. Dodatkowo w tekście pojawia się w kilku miejscach (str. 103, 105) skrót pisany „PF”, co również komplikuje zrozumienie.

Rozdział IV zawiera wyniki prac badawczych doktorantki, które ilustrowane są czytelnymi i bardzo rzetelnie opisanymi rycinami w formie zdjęć, wykresów, chromatogramów oraz schematów i tabel, ponumerowanych zgodnie z kolejnością rozdziałów. Uzyskane wyniki są poprawnie interpretowane. Na niektórych wykresach zabrakło opisu osi, jak np. oś Y na Rycinie IV-29 zawiera jedynie jednostkę (cfu/ml), bez wskazania badanego parametru, którym w tym przypadku powinna być np. gęstość hodowli bakteryjnej wyrażona jako cfu/ml. Zastanawiające jest także zastosowanie skrótu „FACs” zamiast powszechnie stosowanego „FACS”, (ang. Fluorescence-activated Cell Sorting), oznaczającego wykorzystaną technikę

cytometrii przepływowej. Część wyników zawartych w przedstawionej rozprawie doktorskiej została wcześniej opublikowana, co autorka wskazała na początku każdego podrozdziału zawierającego takie treści.

Dyskusja wyników poprowadzona jest w logiczny i ciekawy sposób z odniesieniem do wyników innych badań oraz z uwzględnieniem aktualnej literatury. Podsumowanie wniosków jednego z badanych obszarów przedstawiono także w formie schematu ilustrującego potencjalne sposoby modulacji internalizacji bakterii przez modelowe monocyty. Zgodnie z oczekiwaniem ten rozdział zawiera odpowiedzi na stawiane na początku rozprawy pytania i hipotezy, odnoszące się do budowy i znaczenia pęcherzyków OMVs bakterii *M. catarrhalis* w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń układu oddechowego. Najważniejsze wnioski autorka podsumowała w osobnym rozdziale na str. 170-171.

W pracy zawarto także wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografię obejmującą 465 pozycji, głównie najbardziej aktualnego piśmiennictwa, spis tabel i rycin. Podsumowując, praca jest spójna tematycznie z wyraźnie przedstawionym celem, hipotezami, a także wyczerpującym opisem przebiegu prac doświadczalnych, interpretacji wyników i wypływających z nich wniosków. Dopelnieniem rozprawy są informacje końcowe na temat dorobku naukowego doktorantki, w tym publikacje i doniesienia konferencyjne, udział w projektach badawczych, odbyte staże naukowe oraz uzyskane wyróżnienia, które pokazują zaangażowanie, aktywność i osiągnięcia naukowe doktorantki.

Ocena merytoryczna

Podjęta w pracy tematyka obejmuje szczegółowe poznanie roli czynników wirulencji zawartych w pęcherzykach błony zewnętrznej bakterii *M. catarrhalis*, istotnych w patogenezie zakażeń dróg oddechowych u dzieci i dorosłych. Badania miały na celu: 1) ustalenie budowy i składu OMVs, głównie w kontekście antygenów białkowych, 2) wyjaśnienie zmiany wrażliwości wybranych bakterii Gram-ujemnych, wywołujących infekcje układu oddechowego, na działanie dopełniacza oraz peptydów kationowych w obecności OMVs, 3) określenie wpływu OMVs na nieswoistą i swoistą odpowiedź immunologiczną gospodarza podczas zakażenia.

Zakażenia *M. catarrhalis* dotyczą często pacjentów dorosłych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP), dzieci z zapaleniem ucha środkowego i zatok, a także związane są z zaostrzeniem objawów astmy oskrzelowej. Zrozumienie procesów patofizjologicznych w

zakażeniach *M. catarrhalis* wymagają dokładniejszego poznania biologii tych patogenów, obejmujące rolę OMVs w oddziaływaniu z układem odpornościowym oraz z innymi mikroorganizmami zasiedlającymi układ oddechowy.

W tym celu doktorantka na początku określiła budowę i skład OMVs wydzielanych przez bakterie *M. catarrhalis*, potwierdzając typową dla tych struktur wielkość, ładunek oraz obecność kluczowych białek błony zewnętrznej i lipooligosacharydów.

W dalszych etapach prac zbadano wrażliwość wewnątrz- i zewnątrzgatunkową panelu współwystępujących patogenów dróg oddechowych na działanie układu dopełniacza wykazując, że OMVs ułatwiają przetrwanie bakterii zwykle wrażliwych na działanie surowicy. Podobną obserwację wykazano w przypadku substancji permeabilizujących błonę, jak peptydy kationowe, np. polimyksyna B. Ustalono, że ochronny efekt wynikał z asocjacji tych substancji na powierzchni pęcherzyków, chociaż nie zapewniało to pełnej ochrony bakteriom. Interesującym wynikiem był zaobserwowany wzrost wirulencji innych bakterii w obecności pęcherzyków wyizolowanych z *M. catarrhalis* M6. Efekt dotyczył nie tylko bakterii tego samego, ale także innych gatunków, jakie badano na modelu przeżywalności larw barciaka większego.

Regulację swoistej odpowiedzi układu odpornościowego prowadzono na modelu mysim, po immunizacji wyizolowanymi OMVs oraz całymi bakteriami. Pęcherzyki *M. catarrhalis* M6 okazały się immunogenne i powodowały produkcję dużej liczby specyficznych przeciwciał IgG, choć o niższej avidności w porównaniu do przeciwciał powstałych w odpowiedzi na całe bakterie. Uzyskane surowice stały się także cennym narzędziem do identyfikacji znanych oraz nowo wykazanych antygenów znajdujących się w pęcherzykach, w tym kluczowych czynników wirulencji zaangażowanych w hamowanie działania dopełniacza, adhezję bakterii oraz pozyskiwanie żelaza z białek gospodarza.

Odpowiedź nieswoistą organizmu na OMVs, potwierdzono poprzez określenie wpływu pęcherzyków na działanie układu dopełniacza, wydzielania czynników zapalnych, aktywacji neutrofilii oraz właściwości komórek żernych. Zaobserwowano, że OMVs w różny sposób modulują odpowiedź układu odpornościowego gospodarza. Wyniki wskazują na to, że w zależności od poziomu pęcherzyków wzmacnia się efekt ochronny surowicy na zakażenie i powoduje uwrażliwienie bakterii na działanie surowicy poprzez aktywację dopełniacza i tworzenie kompleksu MAC, ale w przypadku nadmiaru pęcherzyków może dojść do przełamania bariery gospodarza i zapewnienia bakteriom ochrony przed atakiem ze strony

układu dopełniacza. Dodatkowo OMVs uruchamiały silną odpowiedź prozapalną w wykorzystanych modelowych komórkach monocytarnych oraz nabłonkowych, choć z różnym natężeniem. Obecność w środowisku OMVs może również hamować fagocytozę drobnoustrojów przez makrofagi, osłabiając odpowiedź gospodarza na zakażenie, co częściowo tłumaczy się blokowaniem receptorów typu PRR i FcR. Wyniki wykazały również stymulację degranulacji neutrofilów w zakresie uwalniania silnie zapalnych mediatorów, jak lipokalina związana z żelatynazą czy elastazą neutrofilową (NE). Ten ostatni czynnik powodował proteolizę białek błony zewnętrznej związanych z wirulencją *M. catarrhalis*, jak białka zaangażowane w adhezję, o aktywności lipolitycznej oraz wychwyt żelaza z transferryny, co jednak nie warunkowało śmierci drobnoustrojów, choć uwrażliwiało oporne szczepy na działanie układu dopełniacza z surowicy.

Podsumowując, w pracy przedstawiono szereg nowych i istotnych informacji na temat budowy i roli OMVs w patogenezie oraz odpowiedzi gospodarza na zakażenie bakteriami *M. catarrhalis*, poszerzając wiedzę na temat biologii tego gatunku. Wykazano, że OMVs stanowią rezerwuuar znanych oraz nowych białek immunogennych, podkreślając znaczenie tych struktur w dalszych badaniach nad wirulencją i immunogennością bakterii. Pęcherzyki błony zewnętrznej jako nosniki antygenów bakteryjnych okazały się wpływać na odpowiedź ze strony gospodarza. W szerokim panelu doświadczeń dotyczących nieswoistej i swoistej odpowiedzi układu odpornościowego, wykorzystując kompleksowe podejście badawcze obejmujące szeroki wachlarz metod i modeli badawczych (*in vitro* oraz *in vivo*), pokazano modulujące właściwości OMVs. Wyniki potwierdzają rolę pęcherzyków w wydzielaniu cytokin prozapalnych przez komórki nabłonka i monocyty, aktywacji układu dopełniacza, stymulacji neutrofilów oraz hamowaniu fagocytozy, a także uwrażliwianiu bakterii na działanie dopełniacza na skutek proteolizy przez uwalniane enzymy. Zagadnienia nabierają jeszcze większego znaczenia w przypadku infekcji dróg oddechowych, szczególnie w sytuacji obniżonej odporności. Do dalszej weryfikacji pozostaje wyjaśnienie znaczenia klinicznego uzyskanych wyników.

Umieszczone w rozprawie wyniki badań, które przedstawione są w elegancki i przejrzysty sposób na licznych rysunkach, potwierdzają wyciągnięte wnioski na temat budowy i składu oraz roli pęcherzyków błony zewnętrznej bakterii *M. catarrhalis* w modulowaniu odpowiedzi ze strony organizmu na zakażenie. Należy podkreślić, że część eksperymentalna została starannie zaplanowana, obejmując najważniejsze aspekty odpowiedzi układu odpornościowego, z uwzględnieniem różnorodnych, adekwatnych i nowoczesnych technik

badawczych oraz niezbędnych kontroli eksperymentalnych, a uzyskane wyniki zostały dokładnie przedyskutowane w kontekście najnowszych doniesień literaturowych, potwierdzając dobrą znajomość tematyki. Istotnym jest, że doktorantka wskazała także nowe kierunki badań wynikające z uzyskanych wyników, co świadczy o potencjale na dalszy rozwój naukowy.

W trakcie oceny niniejszej rozprawy doktorskiej nasunęły się następujące pytania i komentarze, które należy rozważyć w przypadku kontynuacji badań.

- 1) W badaniach wykorzystano jako model badawczy linie komórkowe ludzkiego nabłonka (A549) i monocyty (THP1), które są liniami nowotworowymi. Wyciąganie wniosków na podstawie pojedynczej linii komórek, nie pozwala na stwierdzenie, że obserwowany efekt jest uniwersalny, a na taki wskazuje wniosek ze str. 134: „...OMVs *M. catarrhalis* uruchamiają silną odpowiedź prozapalną zarówno z udziałem leukocytów jak i komórek zaangażowanych w odporność błon śluzowych.....”
Pożądane jest więc rozszerzenie badań z wykorzystaniem co najmniej 2 linii każdego rodzaju, najlepiej nienowotworowych lub w modelu *in vivo*. Krew obwodowa ochotników, z której izolowano neutrofile, jest także stosowanym modelem i źródłem prawidłowych monocytów oraz innych komórek.
- 2) Czy potwierdzono eksperymentalnie, że wyizolowane z krwi ochotników PMNs to populacja neutrofili? Dodatkowa charakterystyka, np. barwienie specyficznymi markerami pozwoliłaby rozwiać wątpliwości dotyczące rodzaju i homogenności uzyskanej frakcji komórek.
- 3) Na Ryc. IV-3a można zaobserwować więcej prążków niż te zaznaczone, np. prążek znajdujący się tuż nad prążkiem C i poniżej prążka F. Podobnie, na panelu c można zaobserwować prążek na wysokości ~ 160 kDa, który także został pominięty w opisie wyników. Czy wiadomo, że reprezentują one artefakty, czy można przypuszczać, że są to nowe, białka nieopisane w literaturze (panel a, barwienie Coomassie) oraz wielkocząsteczkowe oligosacharydy (panel c, barwienie srebrem)? Podobne pytanie nasuwa się w przypadku Ryc. IV-17, gdzie na panelu a na membranie wybarwionej z przeciwciałami anti-Mc6 można zaobserwować dodatkowe delikatne prążki na wysokości ~80 kDa i ~130 kDa, pominięte w opisie wyników. Jaka jest przypuszczalna natura obserwowanych prążków, jeśli w żelu poliakrylamidowym wybarwionym na białka nie są one widoczne? Obecność dodatkowych antygenów w preparatach OMVs sugerowana jest także przy opisie wyników nt miana i avidności

- przeciwciał anty-OMVs na Ryc. IV-14, str. 119, gdzie autorka stwierdza, że „poliwalentna antysurowica nakierowana wyłącznie na białka błony zewnętrznej *M. catarrhalis* zawiera przeciwciała o większym powinowactwie w porównaniu do tych rozpoznających oprócz białkowych również inne niebiałkowe antygeny powierzchniowe”, w domyśle obecne w preparacie wyizolowanych OMVs.
- 4) Do oceny specyficzności reakcji przeciwciał anty-Mc6 w eksperymencie na Ryc. IV-15b oraz IV-17a przydatne byłyby obrazy membran wybarwionych z pominięciem pierwszorzędowych przeciwciał, czyli kontrola negatywna z przeciwciałami drugorzędowymi.
 - 5) Bezpośrednie potwierdzenie zidentyfikowanego białka na Ryc. IV-17b jako UspA2 można uzyskać w WB ze specyficznymi przeciwciałami anty-UspA2, czego w pracy zabrakło.
 - 6) Ochronna rola OMVs przed permeabilizacją błony bakterii opisana w rozdziale 2.3.1 na str. 106 jedynie pośrednio wskazuje na efekt wywołany kompleksem MAC. Bezpośrednie wykazanie udziału białek dopełniacza możliwe byłoby przez użycie inhibitorów czynników dopełniacza lub przeciwciał neutralizujących.
 - 7) Na Ryc. IV-9 przedstawiono wyniki asocjacji OMVs Mc6 z różnymi bakteriami. Jak wytłumaczyć swoistość pęcherzyków do adhezji jedynie z bakteriami tego samego rodzaju?
 - 8) Jaki jest powód obniżenia tempa wzrostu bakterii w obecności OMVs zarówno zasocjowanych jak i wolnych przedstawiony na Ryc. IV-10c i d?

Praca napisana jest poprawnym stylem i językiem typowym dla dyscypliny, chociaż pojawiły się nieliczne pomyłki lingwistyczne, dlatego można się zastanowić nad ich uwzględnieniem w przyszłych opracowaniach wyników. Warto także rozważyć stosowanie terminologii, która istnieje w języku polskim, zamiast stosować spolszczenia nazw angielskich lub sloganów językowych, np. prewalencja, klirens, dyskryminacja zapalenia (rozróżnienie), al., komórki epitelialne, spoty (plamki), pula (mieszanina). Przedstawione uwagi nie wpływają jednak na bardzo wysoką końcową ocenę merytoryczną rozprawy.

Podsumowanie

W mojej ocenie, przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Roszkowiak zawierająca wyniki przeprowadzonych badań stanowi ważny wkład w poszerzenie wiedzy na

temat biologii bakterii z gatunku *M. catarrhalis*. Dostarcza ona nowych informacji na temat antygenowego składu wydzielanych pęcherzyków błony zewnętrznej (OMVs) oraz ich roli w oddziaływaniu z mikroorganizmami współzasiedlającymi drogi oddechowe. W pracy opisano także rolę pęcherzyków w kontekście odpowiedzi gospodarza na zakażenia bakteriami *M. catarrhalis*, często towarzyszące pacjentom z POChP, zapaleniem ucha środkowego i zatok oraz astmą oskrzelową. Wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad uniwersalnym znaczeniem obserwacji oraz ich wykorzystaniem w praktyce.

Poza tym, na uwagę zasługuje biegłość doktorantki w wykorzystaniu różnorodnych i zaawansowanych metod oraz modeli badawczych z zakresu mikrobiologii, immunochemii i proteomiki, co pozwoli w przyszłości na kompleksowe prowadzenie samodzielnych badań w obszarze biologii bakterii czy immunologii. Podkreślenia wymaga fakt, że część badań została przeprowadzona w ramach współpracy z prof. Miguelem Valvano, Queen's Belfast University, podczas odbytego stażu naukowego, co również świadczy o otwartości na poszukiwanie możliwości rozwiązywania problemów badawczych poza jednostką macierzystą. Częściowo, wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w prestiżowych, recenzowanych czasopismach (*Mediators of Inflammation*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Scientific Reports*), w których doktorantka jest współautorem, potwierdzając ich wartość merytoryczną.

Mając na uwadze rzetelność przeprowadzonych badań oraz ich prezentację, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pani mgr Justyny Roszkowiak bardzo wysoko. Praca spełnia wszystkie kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.). Przedkładam niniejszym Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Justyny Roszkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz rekomendację do podjęcia uchwały o wyróżnienie stosowną nagrodą rozprawy doktorskiej pt. „Pęcherzyki błony zewnętrznej *Moraxella catarrhalis* jako czynniki wirulencji i immunomodulacji”.



dr hab. Magdalena Staniszevska prof. KUL