



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
DZIEKANAT WYDZIAŁU
MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

10-08-2022

I. dz.....zał.....
znak sprawy:

10.08.2022

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr Marcjanny Wimonć**

Praca pt. "Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella* Enteritidis do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego"

wykonana w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Maciej Ugorski

Promotor pomocniczy: dr Rafał Kolenda

Przedstawiona do recenzji praca wpisuje się w bardzo aktualny obszar badań nad zoonozami, które stanowią obecnie globalne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Pałeczki *Salmonella* należą do grupy najważniejszych patogenów o potencjale zoonotycznym. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* mogą być izolowane od niektórych zwierząt, będąc składnikiem ich mikrobioty, a jednocześnie są czynnikiem etiologicznym chorób takich jak salmonellozy czy dur brzuszny, mogą także prowadzić do stanu bakteriemii i sepsy. W tym ujęciu badania, których podjęła się Doktorantka, uznać należy za aktualne i ważne dla rozwoju współczesnych nauk biologicznych, weterynaryjnych oraz współczesnej mikrobiologii. Tematykę i zakres badań ujętych w niniejszej rozprawie uznaję jako bardzo istotne z punktu widzenia problemów zdrowia publicznego. Istotnym dla tematyki pracy jest także fakt iż, aktualnie nie ma dostępnych danych na temat biologicznej funkcji genu *yidR* u *Salmonella* Enteritidis. Również nasza wiedza na temat biologicznej funkcji innych białek, np. białek błony zewnętrznej (Outer Membrane Protein, OMP) wchodzących w skład błony zewnętrznej, jako czynników wirulencji *Salmonella* jest ciągle niepełna. Praca prowadzona była pod opieką prof. dr hab. Macieja Ugorskiego (promotor pomocniczy dr Rafał Kolenda), który od wielu lat, z sukcesami pracuje nad zagadnieniami związanymi z patogenezą pałeczek *Salmonella* ze szczególnym uwzględnieniem w tym zjawisku m.in. fimbrii. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są kolejnym dopełnieniem tych



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej i wnoszą nowe obserwacje oraz są podstawą do prowadzenia dalszych badań.

W rozprawie doktorskiej wyróżniono rozdziały w języku polskim: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, wykaz stosowanych skrótów, wykaz tabel oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp jest zwięzłym, teoretycznym wprowadzeniem do wynikowej części pracy. Autorka przedstawiła w nim krótką charakterystykę pałeczek z rodzaju *Salmonella* w kontekście ich chorobotwórczości, omówione zostały także główne czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez te pałeczki. Osobny rozdział poświęcono biologicznej roli białka YidR. Nieliczne informacje przedstawione w tym rozdziale, bazujące na dostępnej literaturze, potwierdzają zasadność podjętej tematyki rozprawy doktorskiej.

Uwagi i pytania do tej części pracy:

- Przygotowując zestawienia tabelaryczne czy ryciny powinno się zaznaczać źródła, z jakich korzystano przy ich przygotowaniu, w tabeli nr 1, na rycinach nr 1 i 2 nie odnajduje się takich informacji;
- Autorka, przygotowując rozdziały wstępu pracy nie uniknęła niezręczności językowych, np. w określeniach: "enterocyty wykazujące ekspresję chemokiny CCL20" (strona 21), czy „naskórek liści sałaty" (strona 26);
- W pracy wielokrotnie, w odniesieniu do struktury rzęski *Salmonella* używane jest określenie „wić". W opinii recenzenta, używanie nazwy „wić" w kontekście budowy komórki bakterii, jest nieprawidłowe, również nie powinno się zamiennie używać określenia błona komórkowa/błona zewnętrzna (str.24);
- Jak Autorka uzasadnia używanie w pracy słowa „ekspresja" zarówno w odniesieniu do genów jak i białek, a także enterocytów?
- Omawiając we wstępie, zagadnienie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, nie wymieniono, jakże ważnej dla procesu ochrony organizmu przed zakażeniami powodowanymi przez pałeczki *Salmonella*, ochronnej roli układu dopełniacza. Poproszę zatem Doktorantkę o krótkie omówienie tego zagadnienia w kontekście możliwej bakteriemii i sepsy powodowanej przez pałeczki *Salmonella*;
- Omawiając czynniki wirulencji mające wpływ na kolonizację układu pokarmowego przez pałeczki *Salmonella*, Autorka nie wspomina o endotoksynie (lipopolisacharyd, LPS), ważnym czynniku wirulencji tej bakterii, dlaczego?



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Celem pracy było wyjaśnienie biologicznej roli w adhezji i inwazji genu *yidR* pałeczek *S. Enteritidis*. Cel postawiony w pracy był realizowany poprzez realizację celów szczegółowych, tj. otrzymanie mutantu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*, porównanie właściwości adhezyjnych i inwazyjnych szczepu wyjściowego i mutantu delecyjnego, wpływ delecji genu *yidR* na ekspresję genów *fimA* i *sicA* oraz analizę udziału białka YidR w procesie zakażenia, a także analizę wpływu delecji genu *yidR* na metabolom *Salmonella*. Zasadnicze cele pracy zostały osiągnięte, zostały także nakreślone i zaproponowane, na podstawie uzyskanych wyników, dalsze perspektywy badań, co uważam za cenny element pracy doktorskiej.

Materiały i metody przedstawione są bardzo czytelnie. Przygotowane zestawienia tabelaryczne (spis odczynników chemicznych, enzymów, antybiotyków, przeciwciał, buforów i roztworów, standardów, starterów, wektorów plazmidowych, szczepów, podłoży mikrobiologicznych czy linii komórkowych, a także wykorzystanej aparatury) ułatwiają analizę. Tę formę opracowania oceniam bardzo wysoko. Należy podkreślić, iż w zakresie metodyki, Autorka opanowała wiele zaawansowanych technik badawczych z obszaru mikrobiologii, biologii molekularnej, genetyki i immunologii.

Pytania do tej części pracy:

- Dlaczego w metodyce wykorzystywanej w pracy z bakteriami, wyznaczając krzywą wzrostu dla hodowli bakterii pobierano jedną kolonię bakterii? Na podstawie jakiego źródła zastosowano taką metodykę?

Otrzymane wyniki potwierdzają nabycie przez Doktorantkę cennych umiejętności zastosowania nowoczesnych metod molekularnych w badaniach mikrobiologicznych. Autorce rozprawy udało się otrzymać mutantu *S. Enteritidis* z delecją genu *yidR*. Dokonano także charakterystyki otrzymanego mutantu pod względem morfologii i wzrostu. Tę część otrzymanych wyników uważam za bardzo istotną dla wyciągania kolejnych wniosków i planowania następnych kroków w eksperymentach. Za ciekawy wynik uważam także wykazanie, iż delecja genu *yidR* powoduje statystycznie istotne obniżenie inwazyjności pałeczek *S. Enteritidis* wobec testowanych linii komórkowych (Caco-2, Ipec-J2 czy Chic-8E11). Sposób zaprezentowania otrzymanych wyników jest dobry. Ryciny są zasadniczo czytelne, a legendy umieszczone pod rycinami pozwalają na ich analizę.

Pytania do tej części pracy:

- Co Doktorantka rozumie pod pojęciem „agregacji” w odniesieniu do morfologii pałeczek *Salmonella*, jeśli zasadniczo pałeczki te nie tworzą żadnych charakterystycznych skupisk, czy układów, jak łańcuszki, grona, pakiety?



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

- Rycina 20 przedstawia wyniki elektroforezy w 1% żelu agarozowym fragmentu DNA odpowiadającego genowi *yidR* będącego produktem reakcji PCR w gradiencie temperatury. Na jakiej podstawie Doktorantka stwierdza, iż najlepszy wynik uzyskano w temperaturze 60°C?

Dyskusja poprowadzona jest prawidłowo i opiera się na aktualnej i dobrze dobranej literaturze. W podsumowaniu dyskusji nakreślone zostały wskazówki do dalszych badań w zakresie tematyki podejmowanej w pracy doktorskiej.

We wnioskach końcowych Autorka stwierdza, iż białko YidR może być zaangażowane w regulację ekspresji genu *sicA* na poziomie transkrypcji, delecja genu *yidR* prowadzi natomiast do obniżenia zdolności adhezyjnych i inwazyjnych pałeczek *S. Enteritidis* względem testowanych komórek nabłonkowych jelit. Pozostaje do wyjaśnienia rola genu *yidR* w metabolizmie komórek *S. Enteritidis*.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska pt. "Rola genu *yidR* w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella* Enteritidis do komórek nabłonkowych pochodzenia jelitowego" została dobrze zaplanowana i wykonana. Uzyskano w niej interesujące i ważne naukowo wyniki. Mgr Marcjanna Wimonć wykazała się umiejętnościami w zakresie planowania koncepcji pracy; wykonania szeregu eksperymentów z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii i immunologii, prawidłowego wnioskowania oraz przygotowania rozprawy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Marcjanny Wimonć spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022, poz.574).

Zwracam się do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z prośbą o dopuszczenie **mgr Marcjanny Wimonć** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska