



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
dr hab. Anna M. Grudniak



Warszawa, 19.09.2024

RECENZJA pracy doktorskiej mgr Adrianny Łupkowskiej, pt.

„Bakterie przetrwały *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* powstałe w warunkach stresowych”

wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,

pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Laskowskiej

promotorem pomocniczym rozprawy była dr inż. Karolina Stojowska-Swędryńska

Problem rosnącej antybiotykoodporności jest obecnie najpoważniejszym zagrożeniem zdrowia publicznego. Wysoka oporność komórek bakterii na antybiotyki związana jest z licznymi mechanizmami, które są one w stanie wytworzyć aby przetrwać presję antybiotyku. Wiele badań wskazuje, na istotną rolę w tej oporności, zwłaszcza w przypadku biofilmów bakteryjnych, bakterii przetrwałych. Komórki przetrwałe ze względu na swój znacznie spowolniony metabolizm, nie dzielą się w obecności antybiotyku i nie są na niego wrażliwe. Po ustaniu presji antybiotykowej są one zdolne do odtworzenia populacji. Poznanie mechanizmu powstawania komórek przetrwałych może przybliżyć nas do zaprojektowania nowych narzędzi do walki z bakteriami chorobotwórczymi. Celem przedstawionej do recenzji pracy była ocena czy proces wysuszenia i rehydratacji w komórkach *E. coli* i *K. pneumoniae* doprowadza do powstania silnie glikowanych agregatów białkowych, które mają wpływ na powstawanie komórek przetrwałych. Kolejnym zagadnieniem była charakterystyka subpopulacji bakterii tworzących makrokolonie *K. pneumoniae*, poprzez wykonanie analizy proteomu oraz określenie profilu ich wrażliwości na antybiotyki. Ostatnim celem pracy było wykazanie czy wybrane związki o potencjalnym działaniu antibakteryjnym sulforafan i eutektyk *Reline* są w stanie zapobiegać i eliminować komórki przetrwałe wytworzone przez *K. pneumoniae*.

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy ona 129 strony i została opatrzona licznymi rysunkami, w liczbie 41 oraz 12 tabelami. Układ rozprawy jest prawidłowy – typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym, zawiera więc charakterystyczne dla takich opracowań rozdziały, tj. Streszczenie (również w języku angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie oraz spis cytowanej literatury. Rozprawa jest napisana poprawnym specjalistycznym językiem polskim. W kilku miejscach pojawiły się drobne błędy stylistyczne, językowe i edytorskie, które nie wpływają na wysoki walor merytoryczny pracy. Rysunki w formie drukowanej są mało czytelne np. Rys 29. i czasami zbyt małe co utrudnia ich interpretację Rys 13 czy 27.

Ocena poszczególnych rozdziałów rozprawy

Rozdział **Wstęp** obejmuje zaledwie 20 stron rozprawy ale omawia wszystkie niezbędne zagadnienia. Pierwszą część wstępu poświęcono komórkom przetrwałym, omówiono znane czynniki i warunki, które odpowiadają za ich powstawanie. Kolejna część wstępu poświęcona została strukturze biofilmu w którym komórki przetrwałe odgrywają olbrzymie znaczenie, wpływając na antybiotykooporność całej struktury. W tej części szczegółowo omówiono mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie komórek przetrwałych w biofilmie uwzględniając odpowiedź ścisłą, odpowiedź SOS, systemy toksyna-antytoksyna oraz agregację i glikację białek. W kolejnej części wstępu autorka skupiła się na przeanalizowaniu aktualnej wiedzy dotyczącej metod eliminacji komórek przetrwałych. Oddzielna część wstępu poświęcona została nowoodkrytym związkom o właściwościach "anty-persisters", które mogłyby wspomóc antybiotyki w działaniu lub je zastąpić. Szczegółowo omówiono związki: sulfurafan należący do izotiocyanianów oraz eutektyk *Reline*. Izotiocyaniany to grupa związków powstających w wyniku hydrolizy enzymatycznej glukozyolanów, które należą do metabolitów wtórnych obecnych w roślinach krzyżowych. Eutektyki to natomiast związki powstałe poprzez zmieszanie kilku składników, co skutkuje obniżeniem ich temperatury topnienia. Ostatnia część wstępu poświęcona została *K. pneumoniae* jako bakterii o wysokim potencjale chorobotwórczym.

Kolejny rozdział pracy zawiera opis wykorzystywanych w badaniach **materiałów i metod**. Zawarte w nim informacje, w mojej ocenie, pozwalają na odtworzenie najważniejszych eksperymentów. W części metodologicznej pojawiło się kilka nieścisłości, które przytoczę w dalszej części. Przy izolacji agregatów białkowych zabrakło informacji o gęstości hodowli z jakiej izolowano agregaty (znajduje się jedynie informacja o objętości hodowli wykorzystywanej do izolacji), standaryzacja jest tu kluczowa aby porównywać ilościowo uzyskane wyniki. Czy była ona wykonywana? W metodzie opisującej oznaczanie poziomu komórek przetrwałych zabrakło informacji jaką liczbę komórek (czy wszystkie) poddawane były dodatkowej analizie w celu sprawdzenia czy nie są to komórki odporne.

Rozdział **Wyniki** zawiera opis eksperymentalnej części rozprawy doktorskiej. Składa się z 46 stron tekstu wraz z 29 rysunkami i 6 tabelami. Pierwsza część pracy poświęcona została badaniom przeprowadzonym na *E. coli*. Wyniki uzyskane w tej części pracy zostały opublikowane w czasopiśmie *Microbial Research* (2023). W pracy zbadano wpływ wysuszenia i ponownej rehydratacji na agregację białek w komórkach *E. coli* oraz powstawanie komórek przetrwałych. Wykazano, że podczas wysuszenia i rehydratacji wewnątrzkomórkowe białka ulegają agregacji, białka te w komórkach *E. coli* pełnią rolę ochronną, wpływają również na wzrost poziomu bakterii przetrwałych. Podczas stresu zwanego z wysuszeniem/rehydratacją poziom produktów glikacji w komórkach *E. coli* również wzrastał, jednak znajdowały się one głównie we frakcji rozpuszczalnej i nie ulegały agregacji, co nie potwierdziło wcześniejszych założeń. Co według doktorantki mogło być tego przyczyną? Jedną z analiz przedstawioną na Rys. 14 jest poziom glikacji białek wyznaczany na podstawie różnic w ilości głównych produktów glikacji w tym karboksymetylolizyny (CML). W pod punkcie (C) przedstawiono wyniki analiz dla wszystkich subpopulacji komórek poddanych wysuszeniu (4h) W1-W3 oraz rehydratacji (40 min) R1-R3, czy analiza glikacji białek przeprowadzana była dla hodowli kontrolnej i jakie ewentualnie były jej wyniki? Kolejnym zadaniem badawczym, które doktorantka postawiła przed sobą było sprawdzenie czy w komórkach *K. pneumoniae* istnieje korelacja pomiędzy agregacją białek a powstawaniem komórek przetrwałych podobna do obserwowanej u *E. coli*. Ponieważ duża część analiz przeprowadzana była na makrokoloniami poproszę w tym miejscu doktorantkę o doprecyzowanie terminu makrokolonii. Zgodnie z tym co sama opisuje na str 14 oraz Rys.3, makrokolonii to etap powstawania biofilmu, może być to również jedna z form biofilmu. Z definicji biofilm to struktura powstająca na granicy faz, ciekłej oraz stałej. Klasyczne metody badania biofilmu *in vitro* wykorzystują osadzanie komórek z fazy ciekłej podczas wielogodzinnej

hodowli w warunkach stacjonarnych pod ciągłą presją cieczy lub w jej przepływie. Makrokolonie badane przez doktorantkę pozyskiwano nakrapiając 10µl hodowli płynnej na pożywkę stałą, którą następnie hodowano przez 72h, (taka objętość zapewne wsiąkała w podłoże). Pozyskane w ten sposób kolonie nie odpowiadają koloniom biofilmowym i termin ten według mnie nie powinien być stosowany zamiennie. Czy analizom poddawane były kolonie bakterii pozyskane klasycznymi metodami w celu wykazania różnic pomiędzy nimi a pozyskanymi w pracy makrokoloniami? Na Rys. 20 zaprezentowano makrokolonie *E. coli* dla uwidocznienia różnic pomiędzy klasycznie uzyskanymi koloniami a badanymi makrokoloniami warto by zaprezentować stosowne zdjęcie, podać wymiary pozyskanych w ten sposób kolonii. W tym miejscu pozwolę sobie na dwa dodatkowe pytania techniczne. Jaki był czas inkubacji w 40°C hodowli poddanych stresowi cieplnemu przy eksperymentach zaprezentowanych na Rys. 17-19? Wyniki zaprezentowane na Rys. 22 w podpunkcie (A) prezentują bakterie, które przetrwały inkubację z kolistyną w makrokoloniami (B) po stresie cieplnym. Czy hodowle poddane stresowi były hodowlami płynnymi prowadzonymi w obecności kolistyny? W którym momencie i na jak długo stosowane były warunki stresowe w tym wariantcie eksperymentu? Izolacja bakterii przetrwałych z *K. pneumoniae* wymagała optymalizacji wielu warunków, szczepy kolekcyjne wytwarzały komórki przetrwałe na bardzo niskim poziomie. W dalszej części badań komórki przetrwałe izolowano ze szczepów klinicznych, które charakteryzowały się wyższym poziomem komórek przetrwałych oraz komórek żywych, które nie wykazują wzrostu na podłożach mikrobiologicznych (komórki VBNC). Ta część wyników pozwoliła potwierdzić, że środowiskiem sprzyjającym powstawaniu komórek przetrwałych podobnie jak u *E. coli* są makrokolonie. Bardzo interesującym odkryciem tej części pracy jest szczep *K. pneumoniae* 577-BA, który wytwarzał znacznie większą liczbę komórek przetrwałych w obecności antybiotyków oraz po stresie termicznym oraz dodatkowo wykazywał wysoki poziom oporności na amikacynę oraz meropenem. Wyniki uzyskane w tej części pracy zostały wnikliwie przedyskutowane z uwzględnieniem wszystkich trudności w ich interpretacji. Jak sama autorka sugeruje dla jasności wyników należałoby przedstawić dane dotyczące wszystkich grup komórek (dzielących się, żywych ale nie zdolnych do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych oraz martwych) przed i po dodaniu antybiotyku, uwzględniając jako komórki, które przetrwały działanie antybiotyku obok komórek przetrwałych również komórki żywe nie zdolne do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych. Interesującym wynikiem było wykazanie zjawiska heterooporności wśród badanych szczepów *K. pneumoniae*. Zjawisko heterooporności na kolistynę u *K. pneumoniae* jest zjawiskiem coraz częściej opisywanym w literaturze. Szczepy heterooporne wytwarzają subpopulacje o różnym stopniu wrażliwości/oporności na antybiotyki i rosną w obecności antybiotyku. Pomimo, że analiza ilości agregatów białkowych w komórkach *K. pneumoniae* nie powiodła się, podczas hodowli makrokolonii wyróżniono w nich dwie subpopulacje komórek, formę mukoidalną zlokalizowaną w centrum kolonii oraz formę niemukoidalną zlokalizowaną w pierścieniu okalającym, kolonie te poddano dalszym analizom. Analizowano obecność celulozy oraz fimbrii typu *curli*, w tym celu zastosowano różne techniki barwienia z czerwienią Kongo, Coomasie brilliant blue oraz kalkofluorem, wyniki sprawiały trudności interpretacyjne i nie udało się przyporządkować jednoznacznie określonych morfotypów do makrokolonii wybranych izolatów *K. pneumoniae*. Wykazano, że izolaty kliniczne *K. pneumoniae* mogą tworzyć zróżnicowane subpopulacje o różnej wrażliwości na antybiotyki, różnym poziomie bakterii przetrwałych oraz heteroopornych co może bezpośrednio przyczyniać się do niepowodzenia klasycznych antybiotykoterapii i zmusza nas do poszukiwania skuteczniejszych alternatyw. Największe różnice pomiędzy subpopulacjami centrum i pierścienia zaobserwowano w szczepie *K. pneumoniae* 577-BA. W szczepie tym zbadano również poziom glikacji białek, ze względu na generowanie największej liczby komórek przetrwałych. W subpopulacji pierścienia w badanym szczepie, znajdowało się znacznie więcej żywych, dzielących się bakterii niż w centrum, wykazano że poziom glikacji białek mierzony CML oraz obecnością produktów AGS był odpowiednio 5-krotnie i 3-krotnie wyższy w centrum makrokolonii w porównaniu z jej pierścieniem. Środowisko

makrokolonii *K. pneumoniae* 577-BA sprzyjało powstawaniu bakterii przetrwałych i heteroopornych lepiej niż faza stacjonarna. Aby przybliżyć mechanizmy molekularne obserwowanych różnic porównano proteomy bakterii pochodzących z subpopulacji makrokolonii oraz hodowli płynnej. Przeprowadzone analizy proteomiczne stanowią bardzo wartościową część pracy. Z literatury wiadomo, że powstawaniu bakterii przetrwałych towarzyszy zmniejszenie liczby rybosomów, co skutkuje zmniejszoną liczbą białek rybosomalnych. W komórkach przetrwałych u *E. coli* zaobserwowano również spowolnienie translacji z powodu braku rybosomów oraz degradacji rRNA i tRNA. W pracy zaobserwowano podobne rezultaty, subpopulacja centrum charakteryzowała się najniższym poziomem białek rybosomalnych i jednocześnie najwyższą liczbą bakterii tolerujących antybiotyki. Przeprowadzone analizy proteomiczne pozwoliły wysunąć kilka bardzo istotnych wniosków. Wyższy poziom bakterii przetrwałych oraz VBNC w makrokoloniiach w porównaniu z hodowlą płynną oraz w subpopulacji centrum w porównaniu z subpopulacją pierścienia może być związany pośrednio lub bezpośrednio z mniejszą liczbą rybosomów i nadprodukcją czynnika hibernacji rybosomów Hpf. Zidentyfikowano szereg białek, które mogą być istotne dla powstawania komórek przetrwałych, należą do nich: IhfA, HutH/U, LamB, MscL. Białka zaangażowane w resuscytację komórek uśpionych to natomiast SucC oraz ZapB. Makrokolonie nadprodukcją natomiast białka, które mogą pełnić funkcje ochronne w różnych warunkach stresowych (np. w trakcie działania antybiotyków) należą do nich: GrcA, AacA4, GcvP, MscL, SpeA, ZapB. Pozostałe zidentyfikowane białka, których poziom był znacząco różny zaangażowane są w przebudowę peptydoglikanu należą tu białka DapA, DadA oraz LpoB lub w formowaniu biofilmu białka AstD, MetK, MscL i WrbA. Dla struktury biofilmu kluczowym procesem kontrolującym jego funkcjonowanie oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za wiele kluczowych dla istnienia struktury procesów jest system *Quorum sensing* (QS). System QS typu 2 jest obecny w komórkach *K. pneumoniae*. Czy w uzyskanych makrokoloniiach nie zaobserwowano zwiększonej ekspresji białek zaangażowanych w funkcjonowanie tego systemu np. LuxS, który jest kluczowy dla istnienia biofilmu i ma wpływ na jego antybiotykooporność, jakie mogą być tego przyczyny? Ostatnia część wynikowa poświęcona została kluczowemu zagadnieniu jakim jest eliminacja bakterii przetrwałych, które przyczyniają się do niepowodzenia antybiotykoterapii. W pracy zbadano dwa potencjalne terapeutyki sulforafan należący do izotiocyanianów, który ma udokumentowane działanie antibakteryjne. Mechanizm jego działania polega na indukcji odpowiedzi ścisłej w komórkach bakterii *E. coli* i *K. pneumoniae*, a u *P. aeruginosa* hamuje QS i powstawanie biofilmu. Badania jego skuteczności wobec komórek przetrwałych jak dotąd nie były przeprowadzane. Sulforafan w zależności od stężenia, szczepu i etapu doświadczenia na którym go dodano (razem z antybiotykiem lub po działaniu antybiotyku) może w różny sposób wpływać na poziom bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*. Użycie sulforafanu (4×MIC) po wstępnej inkubacji *K. pneumoniae* z antybiotykiem całkowicie eliminowało bakterie przetrwałe. Natomiast dodanie sulforafanu razem z antybiotykiem powodowało wzrost poziomu bakterii przetrwałych i znosiło efekt działania meropenemu. W tym przypadku prawdopodobnie następowała indukcja odpowiedzi ścisłej u *K. pneumoniae* przez sulforafan, co stymulowało pojawianie się bakterii przetrwałych. Kolejnym potencjalnym terapeutykiem, który postanowiono przetestować był eutektyk *Reline* (chlorek choliny + mocznik). Eutektyki ze względu na właściwości bakteriobójcze, niski koszt produkcji, biodegradowalność oraz znikome właściwości toksyczne względem komórek ludzkich mają obiecujące zastosowanie w preparatach farmaceutycznych. Szereg badań wykazało, że różne ciecze głęboko eutektyczne mogą hamować powstawanie biofilmu. W pracy wykazano, że działanie eutektyku w zależności od szczepu i obecności antybiotyku w różny sposób wpływa na poziom bakterii przetrwałych. Podobnie jak sulforafan, *Reline* może znosić efekt działania meropenemu powodując wzrost poziomu bakterii przetrwałych. Dodanie *Reline* po wstępnej inkubacji z antybiotykiem, powodowało całkowitą eliminację bakterii. Warto jednak zwrócić uwagę, że wymagało to ponad 30 godzinnej inkubacji hodowli z eutektykiem. Potencjalne zastosowanie sulforafanu i *Reline* do eliminacji bakterii przetrwałych wymaga więc dalszych badań.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 321, faks: 22 55 41 402
e-mail: a.grudniak@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

W *Dyskusji* Doktorantka przeprowadziła dokładną analizę wyników uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach i krytycznie je omówiła uwzględniając rezultaty innych badaczy. Dyskusja jest wysoce merytoryczna i stanowi bardzo wysoki walor recenzowanej pracy, świadczy o gruntownej znajomości podjętej tematyki badawczej. Wnioski umieszczone w rozdziale *Podsumowanie* uważam za merytorycznie poprawne. Zacytowane w pracy piśmiennictwo zebrane w rozdziale *Literatura* jest adekwatne do treści pracy zawiera odpowiednio dobrane i aktualne pozycje literaturowe.

Do realizacji zadań badawczych Pani Adrianna Łupkowska zastosowała szereg adekwatnych i zróżnicowanych metod, które w wielu aspektach wymagały optymalizacji i standaryzacji np:

- (1) izolacja i oznaczanie poziomu komórek przetrwałych w obecności antybiotyków po szoku cieplnym wysuszeniu i ponownej rehydratacji, oznaczanie komórek żywych oraz żywych nie zdolnych do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych,
- (2) detekcja i immunodetekcja białek, detekcja glikowanych białek,
- (3) izolacja i oczyszczanie agregatów białkowych, oznaczanie pochodnych karbonylowych w białkach, wirowanie w gradiencie Percollu
- (4) metody statystyczne, konieczne do analizy uzyskanych danych.

Stosowanie tak rozmaitych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Na koniec chciałam podkreślić, że przedstawione w recenzji uwagi, nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją wysoką ocenę całości rozprawy przedłożonej mi do recenzji. Cel naukowy został osiągnięty. Dodatkowo należy podkreślić, że praca z komórkami przetrwałymi nie należy do łatwych a techniki umożliwiające ich badanie nie są jeszcze dopracowane i ustandaryzowane, tym bardziej uzyskane wyniki uważam za bardzo istotnenaucowo. W mojej opinii, przedstawiona praca stanowi wartościowe opracowanie, a jej wyniki wnoszą nowe treści do ogólnej wiedzy na temat komórek przetrwałych. Eliminacja komórek przetrwałych jest istotna w aspekcie skuteczności antybiotykoterapii i walki ze zjawiskiem antybiotykoodporności.

W mojej ocenie recenzowana rozprawa doktorska **mgr Adrianny Łupkowskiej** spełnia wszystkie wymogi określone ustawowo zgodnie z artykułem art. 187 ust. 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Wnioskuje więc do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie **mgr Adrianny Łupkowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Grudniak

dr hab. Anna Grudniak