



**WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII**

**Zakład Biofizyki**

**Prof. dr hab. Tadeusz Sarna**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho, zatytułowanej  
“Analiza cech genotypowych i fenotypowych warunkujących odpowiedź *Staphylococcus aureus* na inaktywację fotodynamiczną”**

Pojawienie się szczepów opornych na większość antybiotyków skłoniło niektórych badaczy do rozważań o nadchodzącym końcu ery antybiotyków. Wzrastająca oporność bakterii na znane antybiotyki uzasadnia więc intensywne poszukiwania alternatywnych terapii bakteriobójczych w tym metod zwalczania infekcji wywołanych przez wielolekooporne mikroorganizmy. Do takich metod należy przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (PDT). Uważa się, że wytworzenie przez bakterie skutecznej oporności przeciw PDT będzie bardzo trudne. Ma to związek z generowaniem w zjawiskach fotodynamicznych tzw. reaktywnych form tlenu i azotu, które jako silne utleniacze, zdolne są do modyfikacji chemicznych kluczowych składników komórki, niebędnych dla jej normalnego funkcjonowania. To, między innymi, odróżnia działanie antybiotyków od fotodynamicznej inaktywacji, zachodzącej przy udziale cytotoksycznych reaktywnych form tlenu. Nie oznacza to jednak, że wszystkie bakterie i grzyby wykazują taką samą, lub nawet zbliżoną podatność na fotodynamiczną inaktywację. Ma to związek ze zróżnicowaną przepuszczalnością błon i osłon komórek bakteryjnych w stosunku do konkretnych barwników fotosensybilizujących odpowiedzialnych za fotogenerowanie reaktywnych form tlenu, oraz różną efektywnością mechanizmów chroniących bakterie przed stresem oksydacyjnym.

Tą ważną i aktualną tematyką badawczą zajmowała się mgr Monika Kossakowska-Zwierucho w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed, którym z wielkim powodzeniem prowadzi badania z tego zakresu. Wyniki swoich badań mgr Kossakowska-Zwierucho przedstawiła w rozprawie doktorskiej, zatytułowanej “Analiza cech genotypowych i fenotypowych warunkujących odpowiedź *Staphylococcus aureus* na inaktywację fotodynamiczną”, której promotorem jest prof. Krzysztof Bielawski a promotorem pomocniczym dr Jonna Naskonieczna. Należy podkreślić, że najważniejsze wyniki, jakie we współpracy z innymi badaczami uzyskała mgr Kossakowska-Zwierucho, zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopiśmie naukowych.

Rozprawa doktorska M. Kossakowskiej-Zwierucho liczy 100 stron i ma typowy format dla tego rodzaju opracowań. Po krótkim ale treściwym “Streszczeniu” następuje 20-stronicowy “Wstęp”, stanowiący bardzo dobre wprowadzenie w tematykę badań. W dalszej części rozprawy doktorantka sformułowała nadrzędny cel pracy i sprecyzowała trzy cele szczegółowe. Materiały i metody zostały opisane na 18 stronach, natomiast wyniki zajmują

27 stron i jest to to najdłuższa i najważniejsza część rozprawy. Dyskusja uzyskanych wyników znajduje się na kolejnych 10 stronach rozprawy i uzupełniona jest pół-stronicowym podsumowaniem. Wnioski, które odpowiadają zamierzonym celom, sformułowano w postaci 5 punktów. Rozprawa kończy się spisem zamieszczonych rycin i tabl oraz spisem literatury, zawierającym 135 najważniejszych pozycji ściśle związanych z tematyką badań.

We "Wstępie", doktorantka najpierw charakteryzuje chorobotwórczość i czynniki wirulencji, jak również lekooporność *Staphylococcus aureus*, który uważa się za patogen alarmowy, czyli zdolny do ucieczki przed działaniem antybiotyków. To właśnie ten gatunek bakterii był przedmiotem badań mgr Kossakowskiej-Zwierucho. Doktorantka opisuje następnie najważniejsze procesy fotofizyczne i fotochemiczne zaangażowane w reakcjach fotosensybilizowanego utlenienia, które odgrywają kluczową rolę terapii fotodynamicznej. W rozumieniu doktorantki termin "inaktywacja fotodynamiczna" (PDI), czy używany zamiennie "fotoinaktywacja", odnosi do ogółu procesów zachodzących pod wpływem połączonego działania fotouczulacza, światła i tlenu, wywołujących toksyczne efekty w danej populacji komórek. Nie ulega wątpliwości, że takie całościowe podejście do fotodynamicznej inaktywacji bakterii jest o wiele bardziej zasadne niż nawet najbardziej szczegółowa analiza wybranych efektów. Doktorantka charakteryzuje najważniejsze fotosensybilizatory ze względu na ich właściwości optyczne i stosowalność w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Stosunkowo obszernie omówiona jest odpowiedź *S. Aureus* na stres oksydacyjny, w tym zdolność bakterii do syntezy stafyloksantyny, barwnika o przeciwutleniających właściwościach, zlokalizowanego w błonie komórkowej, oraz do ekspresji enzymów neutralizujących niektóre reaktywne formy tlenu, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, reduktaza wodoronadtlenków alkilowych i peroksyredoksyny. Rzeczowo i wszechstronnie scharakteryzowana została odpowiedź stresowa *S. Aureus* zależna od alternatywnego czynnika  $\sigma^B$  oraz sformułowano postulat, iż czynnik ten jest jednym z kluczowych elementów odpowiedzi *S. Aureus* na stress fotodynamiczny towarzyszący PDI. "Wstęp" pokazuje, że doktorantka bardzo dobrze orientuje się w tematyce naukowej związanej z prowadzonymi badaniami i, co również ważne, potrafi dokonać właściwego doboru omawianych zagadnień.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej mgr Kossakowskiej-Zwierucho była analiza cech fenotypowych i genetycznych, które decydują o wrażliwości szczepów *S. Aureus* na inaktywację fotodynamiczną z użyciem kilku wybranych fotosensybilizatorów. Dla osiągnięcia tego celu, doktorantka postanowiła zrealizować trzy szczegółowe cele badawcze:

1. Określić udział operonu  $\sigma^B$  w odpowiedzi *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną
2. Przeprowadzić analizę genetyczną i funkcjonalną systemu aktywacji alternatywnego czynnika  $\sigma^B$  w szczepach klinicznych *S. aureus*

3. Zanalizować cechy fenotypowe warunkujące wrażliwość *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną z uwzględnieniem udziału stafyloksantyny, płynności bakteryjnej błony komórkowej i aktywności katalazy.

Materiały i metody zawierają informację niezbędną dla odtworzenia warunków wykonanych doświadczeń i pomiarów w niezależnych badaniach, co jest wymaganym kryterium badań naukowych. Na podkreślenie zasługuje analiza odpowiedzi aż 26 szczepów referencyjnych i klinicznych *S. aureus* na stress fotodynamiczny indukowany diargininianem protoporfiryny IX (PPArg2), błękitem toluidyny O, porfiryką kationową TMPyP, różem bangalskim (RB), ftalocyjaniną cynkową (ZnPC) i fullerenopirolidyną. Wybrane szczepy *S. aureus* różniły się obecnością genów kontrolujących działanie czynnika  $\sigma^B$ , determinujących ekspresję katalazy w komórkach bakteryjnych i zawartość stafyloksantyny w błonach komórkowych. Testowane fotosensybilizatory, należące do pięciu różnych grup barwników, były rozpuszczalne w wodzie i wykazywały maksimum absorpcji promieniowania w zakresie światła widzialnego, od 400 do 700 nm. Fotowzbudzanie barwników, po inkubacji z bakteriami, odbywało się poprzez naświetlanie próbek światłem czerwonym lub zielonym emitowanym przez specjalnie skonstruowane w tym celu lampy LED. Ze względu na właściwości optyczne i stosowane stężenia fotosensybilizatorów, stopień akumulacji w komórkach *S. aureus* został zanalizowany jedynie dla PPArg2. Izolacja genomowego DNA bakteryjnego, amplifikacja genów, sekwencjonowanie i analiza sekwencji nukleotydowej operonu sigB *S. aureus* oraz określenie struktur pierwszorzędowej i drugorzędowej białka RsbU *S. aureus*, jak również izolacja i odwrotną transkrypcja całkowitego RNA bakteryjnego oraz PCR w czasie rzeczywistym, zostały wykonane standardowymi metodami biologii molekularnej. Natomiast typowe metody biochemiczne zostały zastosowane do ekstrakcji karotenoidów ze *S. aureus* i pomiaru aktywności katalazy. Do pomiaru płynności błony komórkowej *S. aureus* doktorantka użyła sondy fluorescencyjnej – 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrienu, która lokalizuje się w części hydrofobowej dwuwarstwy fosfolipidowej i, w zależności od szybkości reorientacji cząsteczek, wykazuje fluorescencję o różnym stopniu polaryzacji. Wszystkie zastosowane przed doktorantką metody, zwłaszcza metody biologii molekularnej i komórkowej oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników, należy uznać za adekwatne dla realizacji zamierzonych celów.

Zastosowanie szczepów referencyjnych, tj. typu dzikiego USA300 oraz czterech mutantów izogenicznych ( $\Delta$ rsbU,  $\Delta$ rsbV,  $\Delta$ rsbW i  $\Delta$ rsbB) umożliwiło doktorantce stwierdzenie, iż szczepy o zaburzonej aktywności  $\sigma^B$  są szczególnie wrażliwe na inaktywację fotodynamiczną przy udziale PPArg2, ZnPC i RB. Ten ważny wynik potwierdzono w przypadku szczepów referencyjnych SH1000 oraz RN6390. Z uwagi na mniejszą efektywność fotodynamiczną pozostałych trzech barwników, przynajmniej w warunkach przeprowadzonych doświadczeń, fotosensybilizatory te zostały wyłączone z dalszych badań. Nasuwa się jednak pytanie, czy porównanie fotodynamicznej aktywności barwników bez uwzględnienia ich różnych właściwości optycznych, stosowanych stężeń i spektralnej irradancji źródeł promieniowania

jest rzeczywiście uzasadnione. Dokładna analiza fotodynamicznej efektywności fotosensybilizujących barwników, zwłaszcza w układach biologicznych, nie jest łatwa, bo wymaga wielu szczegółowych analiz, w tym normalizacji efektów do wartości splotu funkcji opisujących spektralną emisję promieniowania źródła i absorpcję optyczną barwnika w badanym układzie. Czym kierowała się doktorantka wybierając stężenia poszczególnych barwników? Nie jestem ponadto przekonany, czy "krzywe przeżywalności", przedstawione w rysunku 5 wnoszą istotną informację o badanym zjawisku fotodynamicznym, zwłaszcza jeśli obserwowana zależność pokazuje brak efektu powyżej  $10 \text{ J/cm}^2$ , tj. pierwszej dawki, przy której ma miejsce znaczące zabijanie komórek bakteryjnych. Dość niespodziewaną obserwacją było stwierdzenie względnego braku zależności efektu fotodynamicznego od stopnia akumulacji PPAArg2.

Wyniki, uzyskane w badaniach fotodynamicznej inaktywacji 15 szczepów klinicznych *S. aureus* posłużyły doktorantce do analizy cech genotypowych i fenotypowych warunkujących wrażliwość bakterii na inaktywację fotodynamiczną. Analizując mutacje w obrębie operonu sigB szczepów klinicznych *S. aureus*, mgr Kossakowska-Zwierucho zidentyfikowała szereg mutacji i wynikające z nich zmiany w sekwencji pierwszorzędowej kodowanych białek. Umożliwiło to zaproponowanie schematu struktury drugorzędowej białka RsbU *S. aureus* z uwzględnieniem zidentyfikowanych mutacji, które wpływają na strukturę białka i jego biologiczną aktywność. Należy podkreślić, że jest to pierwszy model strukturalny monomerycznej formy tego białka, jaki opublikowano w literaturze naukowej.

Zastosowanie szczepów referencyjnych, które w wyniku manipulacji genetycznych w obrębie operonu *crtOPQMN* różniły się stopniem pigmentacji umożliwiło porównanie wrażliwości komórek na stres fotodynamiczny, indukowany trzema fotosensybilizatorami, od ilości syntetyzowanych przez komórki karotenoidów. Jak można było oczekiwać bezbarwny mutant SA145 wykazywał najwyższą wrażliwość, podczas gdy szczep 147 z nadprodukcją stafyloksantyny najniższą wrażliwość. Dla potwierdzenia, iż oporność *S. aureus* na fotodynamiczną inaktywację zależy od produkowanych przez komórki karotenoidów, zmierzono zawartość pigment w ekstraktach metanolowych ze szczepów referencyjnych i izolatów klinicznych. Wyniki pokazały, że wszystkie szczepy *S. aureus* o zaburzonej aktywności czynnika  $\sigma^B$  odznaczały się brakiem pigmentacji. Szczepy te wykazywały dużą wrażliwość na stress fotodynamiczny, jednak w przypadku innych szczepów klinicznych nie stwierdzono wyraźnej korelacji pomiędzy ich opornością na inaktywację fotodynamiczną a zawartością karotenoidów, co sugeruje, iż działanie przeciwutleniające stafyloksantyny, chociaż istotne, nie jest jedynym elementem odpowiedzi *S. aureus* na stress fotodynamiczny. Analizując widma absorpcji ekstraktów, doktorantka wnioskuje, iż w przypadku niektórych szczepów, obserwuje się mieszaninę różnych karotenoidów. Szkoda, że nie spróbowano zidentyfikować tych pigmentów stosując bardziej specyficzną analizę po rozdziale HPLC. Innym ciekawym wynikiem jaki uzyskała doktorantka porównując wrażliwość fotodynamiczną różnych szczepów *S. aureus*, jest stwierdzenie, iż szczepy podatne na

inaktywację fotodynamiczną charakteryzują się wysoką płynnością błony komórkowej. Wyniki badań wskazują ponadto na modyfikację płynności błony przez zawartą w niej stafyloksantynę, której ochronne działanie może również polegać na zmniejszeniu płynności błony komórkowej.

Chociaż nadtlenek wodoru nie jest zbyt reaktywny, jego nadmierne stężenie może prowadzić do uszkodzenia struktury i funkcji komórki wyniku tzw. reakcji Fentona. Z tego też względu aktywność enzymów biorących udział w rozkładzie nadtlenku wodoru jest jednym z ważnych mechanizmów ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym. Doktorantka nie zaobserwowała jednak korelacji pomiędzy aktywnością katalazy a opornością szczepów referencyjnych i klinicznych na inaktywację fotodynamiczną indukowaną badanymi fotosensybilizatorami, chociaż stwierdziła wyraźną korelację pomiędzy tolerancją szczepów referencyjnych na  $H_2O_2$  a aktywnością katalazy.

Związła ale treściwa dyskusja uzyskanych wyników odnosi się do wszystkich istotnych aspektów badań. Doktorantka przekonująco interpretuje obserwowane zależności proponując prawdopodobne mechanizmy analizowanych zjawisk. Chciałbym jednak dowiedzieć się dlaczego doktorantka uważa, iż fullereny, w przeciwieństwie do innych użytych w pracy doktorskiej fotosensybilizatorów, działają głównie poprzez fotogenerowanie anionorodnika ponadtlenkowego. Z wyjątkiem nanocząstek nieorganicznych, takich jak ditlenek tytanu i tlenek cynku, pozostałe fotosensybilizatory, nie wyłączając fullerenów, mogą fotogenerować zarówno tlen singletowy, jak i wolne rodniki. To, jakie reaktywne formy tlenu będą preferencyjnie generowane w konkretnym układzie, zależy od różnych czynników, w tym od lokalnego stężenia tlenu molekularnego i donorów elektronu. Ustalenie udziału reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za krytyczne uszkodzenie komórki, które prowadzi do obserwowanego efektu fotodynamicznego, wymaga szczegółowych, odpowiednio zaprojektowanych badań.

Doktorantka pozostawia otwartą kwestię czy przeciwutleniające właściwości stafyloksantyny, czy raczej jej wpływ na strukturę błony *S. Aureus*, odgrywają ważniejszą rolę w obronie bakterii przed stresem fotodynamicznym. W moim przekonaniu świadczy to o dojrzałości naukowej doktorantki, bo bez szeregu specjalistycznych pomiarów i analiz, dywagacje o prawdopodobnych mechanizmach ochronnego działania stafyloksantyny byłyby nieuzasadnioną spekulacją.

Bardzo rzeczowa jest dyskusja o znaczeniu zidentyfikowanych przez mgr Kossakowską-Zwierucho mutacjach w obrębie operonu *sigB*, które decydują o wysokiej wrażliwości *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną w układzie referencyjnym. Można zgodzić się z doktorantką, że opis zidentyfikowanych mutacji, przedstawiony w jej pracy doktorskiej, powinien przyczynić się do pełnego scharakteryzowania systemu aktywacji czynnika  $\sigma^B$ , który w *S. aureus* nie jest wystarczająco poznany.

Chociaż stafyloksantyna znacząco modyfikuje płynność błony komórkowej *S. aureus*, od której zależy wrażliwość bakterii na stress fotodynamiczny, karotenoid ten nie jedynym modulatorem płynności błony komórkowej. W dyskusji doktorantka zwraca więc uwagę na rolę białek błonowych, w tym podjednostki cytoplazmatycznej błonowego transportera hemu i białka Asp23, oraz na wpływ składu lipidowego błony komórkowej.

Ostatnim wynikiem, dyskutowanym w rozprawie doktorskiej, jest dość niespodziewany brak korelacji pomiędzy opornością szczepów *S. aureus* na stress fotodynamiczny indukowany badanymi fotosensybilizatorami a aktywnością komórkowej katalazy. Według doktorantki sugeruje to, iż nadtlenek wodoru nie jest istotnym mediatorem bakteriobójczego działania PDI w badanych warunkach doświadczalnych.

Do najważniejszych wniosków sformułowanych przez mgr Kossakowską-Zwierucho zaliczyłbym wykazanie szczególnej wrażliwości szczepów *S. aureus* o zaburzonej aktywności RsbU-zależnego alternatywnego czynnika  $\sigma^B$  na stress fotodynamiczny oraz ustalenie, że mutacje zidentyfikowane w operonie sigB, skoncentrowane w genie *rsbU* są istotnym czynnikiem związanym z wrażliwością szczepów szpitalnych na inaktywację fotodynamiczną. Wnioski jasno pokazują, że zamierzone cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane.

Mgr Kossakowska-Zwierucho przedstawiła bardzo dobrze zredagowaną rozprawę doktorską, która pozbawiona jest znaczących błędów i uchybień. Z obowiązku recenzenta wskazałem na kilka kwestii, które wzbudziły moje wątpliwości. Są to jednak kwestie dyskusyjne i będę rad usłyszeć od doktorantki opinie w tych sprawach. W kilku miejscach natknąłem się na drobne błędy drukarskie, które wskażę doktorantce. W tym miejscu chciałem jedynie zwrócić uwagę na ewidentny błąd drukarski w drugiej reakcji Tabeli 1. Po reakcji rodnika photosensybilizatora z tlenem cząsteczkowym produktem nie mogą być dwa rodniki jak to zostało przedstawione.

**Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym a dorobek naukowy mgr M. Kossakowskiej-Zwierucho uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, w uznaniu wartościowych wyników naukowych jakie uzyskała doktorantka, wnioskuję o wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.**

