

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 07.04.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Joanny Ewy Strzelczyk
„Characteristics of *Aeromonas salmonicida*, a rainbow trout pathogen, and early
signatures of host immune response”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana przez Doktorantkę na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej. Promotorem rozprawy jest Pan dr hab. Marek Fol, prof. UŁ, zaś opiekunem naukowym z Instytutu Immunologii Friedrich-Loeffler-Institute, Greifswald, był dr Bernd Koellner. Tematyka pracy dotyczy istotnego z punktu widzenia mikrobiologii i ekonomii bakterii patogennych, a mianowicie *Aeromonas salmonicida*. Bakteria ta stanowi coraz poważniejsze zagrożenie dla hodowli ryb w akwakulturach, wpływając na stan zdrowia zwierząt co przekłada się na wymierne straty gospodarcze. Typowym gospodarzem tej bakterii jest pstrąg tęczowy, ryba o dużym znaczeniu ekonomicznym w hodowlach. Podjęcie tematu scharakteryzowania czynników wirulencji i różnic między szczepami tego patogenu, oraz mechanizmów infekcji wraz z odpowiedzią gospodarza jest istotne, zarówno dla przyszłych badań nad zapobieganiem zakażeniom przez *A. salmonicida*, jak i dla szerszej pojętej wiedzy mikrobiologicznej, szczególnie na poziomie interakcji patogen-gospodarz, z uwagi na różnorodne mechanizmy zjadliwości tej bakterii. W swojej pracy Doktorantka korzystała z doświadczenia i zaplecza badawczego i metodologicznego Promotora rozprawy, zwłaszcza w zakresie odpowiedzi immunologicznej

podczas infekcji, oraz wiedzy w zakresie patogenów ryb w laboratorium opiekuna naukowego w Greifswaldzie.

Rozprawa ma formę klasycznej monografii, gdzie wyniki pracy Doktorantki zostały przedstawione i przedyskutowane. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim, ze streszczeniem w języku polskim. Na 121 stronach pracy informacje umieszczono w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, z podziałem na odpowiednie sekcje poprzedzone spisem treści i stosowanych skrótów. Pierwszy, 14 stronicowy rozdział to wstęp, opisujący dość dokładnie hodowle pstrąga tęczowego i zagrożenia ze strony patogennych bakterii wraz z możliwymi sposobami leczenia i zapobiegania. Tylko niecałe 3 strony są poświęcone w tym rozdziale badanemu patogenowi, *A. salmonicida* i powodowanej przez niego chorobie. Co wydaje się zbyt skąpym wprowadzeniem w cel pracy, określony w kolejnym rozdziale. Szczególnie, że trudno jest na tej podstawie wnioskować, co z podanych zadań pracy dostarczy nowe informacje, a co będzie uzupełnieniem już częściowo znanych. Sam cel powinien być sformułowany bardziej jednoznacznie, gdyż w obecnej postaci rozmywa się nieco w pierwszym paragrafie tego rozdziału i kolejno opisanych zadaniach, zwłaszcza gdy są one przedstawione niekonsekwentnie - część zadań jako plany badawcze – „analysis”, „comparison” a inne jako już wynik badań – „Signatures of bacteremia are visualized by extracellular protein impact...”. **Podczas obrony, oczekiwałabym przedstawienia przez Doktorantkę jasno określonego celu (celów) oraz sprecyzowania zadań dla wszystkich części badań.** Dalsza część rozprawy ma zdecydowanie nietypowy układ. Kolejne trzy rozdziały są skonstruowane jako oddzielne historie, zawierające swój krótki wstęp (2-3 stronicowy), materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Ten zabieg, aczkolwiek w zamierzeniu podkreślający odrębność trzech wątków, zdaniem recenzenta wprowadza zbyt duży chaos w przedstawienie danych i nie pomaga w podążaniu za nurtem badań i wniosków Autorki. Przedstawione na koniec rozprawy krótkie konkluzje podsumowują wyniki w punktach, ale nie zastępują odpowiednio przedstawionego toku pracy naukowej. Dobrym podejściem jest natomiast przedstawienie w postaci schematu ogólnego wniosku wynikającego z rozprawy. W pracy wykorzystano 336 publikacji źródłowych zawierających informacje i aktualną wiedzę pomocną w tematyce rozprawy. Podkreślić należy, że poza nietypowym i nie ułatwiającym odbioru pracy podziałem na tematy i podrozdziały, metody i materiały zastosowane w rozprawie opisane są dokładnie i jasno, pozwalając na zrozumienie zastosowanej techniki i uzyskanych przy jej użyciu wyników. Same rezultaty badań są także przedstawione i opisane zrozumiale i zilustrowane rycinami, schematami i tabelami. Rozprawę uzupełniono o materiały dodatkowe (Supplements), dostarczone w wersji elektronicznej, zawierające m.in. zestawy danych z mapowania i

składania genomu, danych transkryptomocnych, analizy receptorów TLR. Rozprawa jest napisana starannym, poprawnym i zrozumiałym językiem, zwraca uwagę niewielką liczbą wyrażen żargonowych czy błędów literowych.

Głównym celem rozprawy była analiza wirulencji *A. salmonicida* i odpowiedzi gospodarza tej bakterii, pstrąga tęczowego, na infekcję. Punktem wyjściowym do tych badań były obserwacje zróżnicowanej wirulencji pomiędzy szczepami *A. salmonicida* oraz szerzej, między różnymi przedstawicielami rodzaju *Aeromonas*, co jest jedną z przyczyn trudności we wprowadzeniu skutecznej szczepionki. Pierwsza część badań eksperymentalnych rozprawy jest skierowana właśnie na poznanie genomu *A. salmonicida*. Krótki wstęp wprowadza w zagadnienie pan-genomu *Aeromonas* oraz zmienności w poziomie wirulencji różnych izolatów. Szczególnie interesująca jest hipoteza o zmianach genetycznych pomiędzy szczepami, skutkujących bardzo szybkim wzrostem wirulencji, co prowokuje do postawienia pytania, co jest przyczyną tych zmian i jaki jest ich mechanizm. Tu miałabym dwa pytania do Doktorantki: **1. Jaka jest rola *A. salmonicida* w mikroflorze ryb?** Czy ewentualne wyeliminowanie tej bakterii na drodze zapobiegania zakażeniu wpłynie negatywnie na funkcjonowanie mikrobiomu? **2. U wielu bakterii patogennych zmiana trybu życia z komensalnego na pasożytniczy jest osiągnięta przez zmiany w ekspresji genów, a nie rearanżacje materiału genetycznego. Dlaczego zatem zakładano, iż w tym przypadku podstawą zmian w wirulencji będzie zmiana w sekwencji genomu?**

W tej części rozprawy zostało przeprowadzone sekwencjonowanie genomów 3 szczepów *A. salmonicida*, o różnym poziomie wirulencji. Chciałam zapytać, **jak został uzyskany szczep JF3239, jako izogeniczny do JF2267 i określony jako niewirulentny.** Czy został on pozbawiony genów kodujących czynniki wirulencji, oraz czy też jego brak wirulencji określono eksperymentalnie?

Wnioski, przedstawione w rozprawie, odnośnie do trzech badanych szczepów, pochodzą zarówno z danych uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji, jak i biochemicznej charakterystyki z użyciem testów API. Opracowanie danych NGS metodami bioinformatycznymi pozwoliło na porównanie struktury genomów (chromosomu i plazmidów) i określenia genów obecnych wyłącznie w określonym szczepie. Szczególnie istotne były informacje dotyczące genów wirulencji. A także identyfikacja potencjalnych, jeszcze nie zadnotowanych ORF. Badania pozwoliły na zidentyfikowanie tak zwanego rdzenia genomu, identycznego dla 3 szczepów oraz wyodrębnienie genów obecnych jedynie u wirulentnego szczepu, prawdopodobnie związanych z jego patogennością. Duża część tych genów znajdowała się na plazmidach, co wyjaśniałoby zmienność szczepów w zakresie wirulencji. Co

ciekawe, utrata określonych genów była także ważna dla determinacji patogenności. Wyniki w tej części rozprawy zostały zaprezentowane jasno i przejrzysto, a dyskusja wskazuje na odpowiednie i uzasadnione wiadomościami z literatury interpretacje. Nowym aspektem przedstawionym w tej części pracy jest m.in. kompleksowe porównanie genomów szczepów *A. salmonicida* o obserwowanych wcześniej różnicach w wirulencji i przedstawienie danych identyfikujących przynajmniej częściowo genetyczne podłoże tych różnic. Ponadto, wyniki te potwierdzają wcześniejsze hipotezy i informacje o dużej plastyczności genomu *Aeromonas*.

Druga część wyników rozprawy przedstawia rezultaty badań ekspresji genów trzech szczepów *A. salmonicida* w różnych warunkach wzrostu, w tym takich odpowiadających zmianom w środowisku naturalnym. Zastosowane warunki są w założeniu stresem dla bakterii, uruchamiając jej mechanizmy adaptacyjne. Celem badań była między innymi weryfikacja hipotezy, iż również specyficzna ekspresja czynników wirulencji będzie w tych warunkach zmieniona, oraz że możliwe będzie zidentyfikowanie nowych dla *Aeromonas salmonicida* genów związanych z patogenezą. Mam tutaj dwa pytania dotyczące metodologii doświadczenia: 1. **Jaki był powód wybrania mikromacierzy zamiast RNAseq?** 2. Jeśli przy zastosowaniu różnych warunków wzrostu, w tym limitujących, obserwowano znaczne wydłużenie czasu generacji, to **czy arbitralny wybór 24 i 48 godz. do pobrania prób odzwierciedlał porównywalną sytuację w komórce bakteryjnej?**

Właściwie zastosowane narzędzia bioinformatyczne pozwoliły na analizę genów o zmienionej ekspresji, a zastosowanie hierarchicznego uporządkowania w postaci diagramów Voronoi umożliwiło wizualizację zmian. Warunki wzrostu wpływały istotnie na ekspresję genów, zaś poszukiwanie nowych genów wirulencji na podstawie kryteriów potencjalnego uczestnictwa w patogenezie dało podstawy do dalszych badań. Jednakże nie do końca zgodziłabym się z wnioskiem zaprezentowanym w konkluzjach, iż warunki wzrostu wpływają na kompozycję genomu – wpływają raczej na regulację ekspresji regulonów i pojedynczych genów. Z uwagi na to, że badane warunki wprowadzają bakterie w stan niedoboru (składników pokarmowych czy kofaktorów) albo stresu (temperatura, ograniczony dostęp do tlenu) chciałam zapytać, **jaki udział w zmianach ekspresji genów ma tu globalny system regulacyjny, odpowiedź ścisła wraz z jej alarmonem, czterofosforanem guanozyny.**

W trzeciej części rozprawy, Doktorantka przeprowadziła badania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, pstrąga tęczowego, podczas wczesnej fazy infekcji. Na tym etapie zostaje uruchomiony wzorzec ekspresji genów bakteryjnych umożliwiających kolonizację, zaś układ odpornościowy gospodarza włącza adekwatne mechanizmy obronne. Badania tych skomplikowanych korelacji są bardzo istotne dla poznania warunków

sprzyjających zakażeniu ryb i utrzymaniu się infekcji. W tym celu zastosowano model hodowlanych linii pstrąga w celu uzyskania komórek do dalszych badań. Wykazano, że bakteryjne białka wydzielane zewnątrzkomórkowo (ECP) powodowały zmiany w morfologii i w rezultacie śmierć erytrocytów, zaś surowica z krwi pstrąga hamowała wzrost bakterii. Najciekawsze eksperymenty przeprowadzono z komórkami izolowanymi z nerki przedniej, głównego organu krwiotwórczego u ryb. Leukocyty pochodzące z nerki przedniej hamowały wzrost bakterii, a co ciekawe, zaobserwowano wyraźnie różnice pomiędzy leukocytami pochodzącymi z dwóch linii ryb. Interesująco, fagocytoza bakterii przez leukocyty i towarzyszący jej wybuch tlenowy zależne były od poziomu wirulencji bakterii. Badania leukocytów pochodzących z różnych organów odpowiedzi immunologicznej ryb po stymulacji bakteryjnym patogenem, wykazały różnice między poziomem wzrostu ekspresji oraz typami receptorów TLR, pełniących ważną rolę w rozpoznawaniu wzorców molekularnych patogenów. Badania nad odpowiedzią immunologiczną pstrąga podczas infekcji *A. salmonicida* wnoszą istotne informacje o podstawach odporności ryb na zakażenie tą bakterią a dobór metodologii związanej z komórkami odpornościowymi jest właściwy i interesujący, z uwagi na wykorzystanie złożonych technik np. rozdziału poszczególnych komórek.

Zaprezentowane w rozprawie wyniki zostały uzyskane z zastosowaniem dobrze dobranych, nowoczesnych metod biologii molekularnej, immunologii i mikrobiologii. Przedstawione rezultaty pracy oraz dyskusja nad ich znaczeniem w świetle dotychczasowej wiedzy o patogennej bakterii *A. salmonicida* wskazuje, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę w tematyce pracy. A także, na jej umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy, interpretowania wyników i konsekwentne podążanie za linią badawczą.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy, chciałabym stwierdzić, iż praca stanowi bardzo ciekawy zestaw wyników badań nad genetycznymi i funkcjonalnymi mechanizmami patogenezы *A. salmonicida*. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wnosi ona wiele istotnych informacji i stawia kolejne pytania, wskazując nowe kierunki badań. Wyniki rozprawy mogą stanowić podstawę dla dalszych badań o charakterze aplikacyjnym, w kierunku zaprojektowania szczepionki przeciwko zakażeniom w akwakulturach oraz profilaktyce zakażeń dzięki poznaniu mechanizmów patogenezы. Z tego względu należy wyrazić nadzieję, że wyniki przedstawione w rozprawie zostaną wkrótce zaprezentowane szerszemu gronu naukowemu w postaci publikacji.

We wniosku końcowym, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Strzelczyk stanowi znaczące osiągnięcie naukowe i istotny wkład w wiedzę na temat patogennej bakterii *Aeromonas salmonicida*. Przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Joanny Strzelczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.