Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,

Uniwersytet Łódzki, Instytut Mikrobiologii Biotechnologii i Immunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, ul. Banacha 12/16

90-237 Łódź, Tel: (42) 6354186, e. mail: chmiela@biol.uni.lodz.pl

Łódź, 20.11.2014 r.

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

OCENA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Szulc-Kiełbik
pt.

„Aktywność funkcjonalna makrofagów ludzkich zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* ze inaktywowanymi genami naprawy podwójnych pęknięć DNA"

Gruźlica jest jedną z najstarszych chorób u ludzi, która wciąż stanowi poważny problem medyczny i społeczny. W jej rozwoju kluczową rolę odgrywają makrofagi, które umożliwiają prątkom *Mycobacterium tuberculosis* przeżycie i namnażanie się w organizmie gospodarza. Bakterie te wykształciły wiele czynników i mechanizmów, które umożliwiają im skuteczne przeciwstawianie się mechanizmom bakteriobójczym makrofagów. Należą do nich mechanizmy hamujące fuzję fagosomów z lizosomami, skutki działania reaktywnych form tlenu (RFT) oraz azotu (RFA). Autorka wyjaśniając przesłanki, które skłoniły Ją do podjęcia tematu badawczego zwróciła uwagę na znaczenie systemów naprawy DNA w ochronie integralności genomu każdego żywego organizmu, w tym również dla przeżycia komórek bakterii.

Za cel pracy obrała ocenę działania w komórkach *M. tuberculosis* dwóch systemów naprawy DNA. Pierwszy z nich to tzw. system NHEJ, oparty na łączeniu podczas naprawy DNA niehomologicznych końców nici, do czego niezbędne są białko Ku i ligaza D zależna od ATP. Drugi z badanych systemów naprawczych to powszechny system oparty na rekombinacji homologicznej (HR) przeznaczony do naprawy zarówno pojedynczych, jak i podwójnych pęknięć DNA. Skuteczne działanie tego systemu jest oparte na aktywności białka RecA, które przyłącza się do DNA tworząc kompleks aktywujący dwuniciową cząsteczkę DNA w losowo wybranych miejscach.

Doktorantka podjęła się oceny roli białka RecA systemu HR oraz białek Ku i Ligazy D systemu NHEJ w ochronie prątków gruźlicy przed bakteriobójczym działaniem ludzkich makrofagów.

Drugi wyznaczony cel pracy obejmował ocenę modulacji przez prątki gruźlicy, z lub bez wymienionych białek naprawczych, aktywności makrofagów. Realizację głównych celów badawczych oparto na badaniach cząstkowych obejmujących ocenę działania bakteriobójczego egzogennych reaktywnych form tlenu (RFT) oraz tlenku azotu (NO), wobec dzikiego szczepu prątków gruźlicy oraz mutantów pozbawionych genów kodujących białka naprawcze. Zaplanowano również ocenę podatności na wewnątrzkomórkowe zabijanie szczepu wzorcowego oraz jego mutantów przez makrofagi ludzkie, a także ocenę aktywności funkcjonalnej makrofagów na podstawie aktywacji białek sygnałowych ERK1/2, wytwarzania przez nie czynników bakteriobójczych oraz cytokin.

Mając na uwadze fakt, iż wiedza na temat mechanizmów przeżycia prątków wewnątrz makrofagów jest niewystarczająca, a problem gruźlicy ciągle narasta, wybór tematu pracy jest jak najbardziej uzasadniony. Zrozumienie tych mechanizmów może stanowić podstawę do poszukiwania nowych sposobów leczenia gruźlicy.

Praca ma charakter monografii o strukturze typowej dla prac doświadczalnych. Przyjęta forma rozprawy została umiejętnie wykorzystana przez Doktorantkę.

Wytłumaczenie ciekawej koncepcji badań zostało poprzedzone dobrze opracowanym, rozbudowanym wstępem teoretycznym, w którym Autorka zaprezentowała informacje na temat patogenezy gruźlicy, czynników wirulencji prątków *M. tuberculosis*, roli makrofagów i limfocytów, a także cytokin wytwarzanych przez komórki odpornościowe w rozwoju i zapobieganiu gruźlicy. Uwzględniła struktury powierzchniowe zaangażowane w rozpoznawanie prątków przez makrofagi, które są dla nich komórkami docelowymi oraz uruchamiane ścieżki sygnałowe. Opisała czynniki wewnątrzkomórkowe m.in. reaktywne formy tlenu oraz azotu umożliwiające niszczenie prątków. Część wstępną zakończyła przedstawieniem mechanizmów zabezpieczających prątki przed uszkodzeniami DNA. Te podrozdziały są szczególnie przydatne w wyjaśnieniu celu pracy.

W nawiązaniu do informacji przedstawionych przez Autorkę we wstępie pracy chciałabym zapytać o proces polaryzacji makrofagów w odpowiedzi na prątki gruźlicy. Czy znane są wyniki badań przeprowadzonych na pacjentach z aktywną lub latentną postacią gruźlicy, które by wskazywały na dominację u osób zakażonych prątkami gruźlicy makrofagów o fenotypie M2.

Rozdział Materiały i metody został napisany poprawnie. Zawiera niezbędne informacje pozwalające na prześledzenie wszystkich procedur stosowanych w realizacji badań. **Drobna uwaga dotyczy używania określeń „oznaczanie poziomu białka"**, zamiast **„oznaczanie stężenia białka", „podłoże wzbogacone FBS-em"**, zamiast **„podłoże wzbogacone FBS". Proszę też Doktorantkę o dodatkowe wyjaśnienia odnośnie stosowanych procedur.**

Czy procedura znakowania prątków FITC miała wpływ na ich żywotność ?

Do różnicowania monocytów THP-1 oraz monocytów krwi obwodowej w dojrzałe makrofagi użyto odpowiednio PMA lub GM-CSF. Czy mechanizm popudzenia

dojrzewania monocytów w obu przypadkach jest taki sam? W opisie metod należałoby uściślić, że za wskaźnik różnicowania monocytów w makrofagi przyjęto istotne zmniejszenie nasilenia ekspresji cząsteczki CD14 a nie występowanie tej cząsteczki, która jest obecna zarówno na monocytach, jak i makrofagach.

Czy do opsonizacji bakterii użyto wyselekcjonowaną surowicę typu AB czy też mieszaninę surowic typu AB? Czy surowica/e użyte do opsonizacji były oceniane na obecność przeciwciał przeciwko antygenom prątków?

Czy w teście oceny pochłaniania prątków znakowanych FITC przez makrofagi blokowano fluorescencję bakterii związanych zewnątrzkomórkowo ?

Czy oceniono bakteriobójcze-przeciwprątkowe działanie gentamycyny stosowanej w stężeniu 1 mg/ml, w celu zabicia bakterii związanych zewnątrzkomórkowo z makrofagami THP-1?

Co oznaczają skróty PD98059 oraz L-NIL i w jakim celu działano tymi czynnikami wraz z apocyniną na makrofagi THP1 przed ich zakażeniem prątkami? Te dane powinny się znaleźć w opisie metod.

Na podstawie jakiej liczby doświadczeń dokonywano analizy statystycznej wyników?

Na podkreślenie zasługuje umiejętność posługiwania się przez Doktorantkę zróżnicowanymi metodami badawczymi, w tym prowadzenia hodowli komórkowych, badań aktywności funkcjonalnej komórek, cytometrii przepływowej, testów immunoenzymatycznych i badań molekularnych służących ocenie aktywacji ścieżek sygnałowych.

Wyniki badań Doktorantka opisała w rozdziale 4, który podzieliła na 8 podrozdziałów i zaprezentowała je na licznych wykresach, w tabelach i na fotografiach obrazujących wygląd komórek, a także wyniki analizy testów Western blot (Immunoblot). Uważam, że pierwszy rozdział IV.1 rozdziału Wyniki powinien być raczej zamieszczony w sekcji III.1.3 zatytułowanej Bakterie, w której scharakteryzowano szczepy stosowane w badaniach. Jak Autorka zaznaczyła zostały one skonstruowane i udostępnione przez dr Annę Brzostek. Nie ma informacji czy szczepy zostały skonstruowane dla potrzeb prezentowanej pracy i czy Doktorantka miała swój udział w ich przygotowaniu.

Oceniając znaczenie systemów NHEJ i HR w przeżywalności szczepów *M. tuberculosis* poddanych działaniu tlenku azotu (NO) lub anionorodnika ponadtlenkowego ($^{\cdot}O_2^-$) Autorka nie wykazała różnic pomiędzy szczepem rodzicielskim i mutantami z defektem systemów naprawy DNA HR lub NHEJ, co skłoniło do wysunięcia wniosku, że czynniki te nie powodują pęknięć DNA u prątków gruźlicy. **W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę jakimi metodami molekularnymi takie pęknięcia można wykryć?**

Autorka wykazała, że tylko nieliczne makrofagi THP-1 pochłaniały komórki szczepów zmutowanych z defektami mechanizmów naprawy DNA, opsonizowane lub nieopsonizowane, w porównaniu do prątków szczepu dzikiego. Wykazała także, że

pojedynczy makrofag pochłaniał znacznie mniejszą liczbę prątków zmutowanych niż nie zmutowanych. Wyniki te mogą wskazywać na znaczenie białek naprawczych DNA we wnikaniu prątków do komórek makrofagowych.

W przypadku potrójnego mutanta wykazane zostało znacznie słabsze wewnątrzkomórkowe jego namnażanie się, niż szczepu dzikiego i pozostałych mutantów. To osłabienie zdolności namnażania się prątków nie było związane ze spadkiem żywotności makrofagów lub zmianami o charakterze apoptozy. Potwierdzono, że zahamowanie wzrostu wewnątrz makrofagów prątków o potrójnej mutacji było wynikiem toksycznego działania NO i anionorodnika ponadtlenkowego, przy braku systemów naprawy DNA. **Nie jest jasna druga część wniosku przedstawionego na str. 85, która brzmi, że „... ani tlenek azotu ani anionorodnik ponadtlenkowy (produkowane przez makrofagi) *per se* nie są zdolne do hamowania namnażania potrójnego mutanta w makrofagach".** Wyniki uzyskane na komórkach THP-1 potwierdzone zostały w doświadczeniach z wykorzystaniem ludzkich makrofagów krwi obwodowej. Stały się one podstawą wniosku o niezbędności systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA do namnażania się prątków wewnątrz makrofagów.

Jednym z celów, jakie Doktorantka sobie wyznaczyła była odpowiedź na pytanie czy aktywność makrofagów może być zależna od białek naprawy DNA prątków gruźlicy. Autorka wykazała, że białka obu systemów w istotny sposób modulowały zdolność makrofagów do wytwarzania TNF-α i IL-10. Jakkolwiek uzyskane wyniki są trudne do interpretacji. Trudno jest bowiem przewidzieć, która z cytokin ma w badanym układzie działanie dominujące. Brak wytwarzania przez makrofagi IL-12, po ich stymulacji badanymi prątkami, Autorka uznała za możliwy efekt immunosupresyjny prątków. **W tym kontekście ciekawe byłoby prześledzenie właściwości makrofagów w odpowiedzi na badane prątki, w środowisku z lub bez rekombinowanej IL-12.** Doktorantka zaobserwowała ponadto, że szczep dziki posiadający biała naprawcze zarówno systemu HR oraz NHEJ hamował wytwarzanie przez makrofagi reaktywnych form tlenu (RFT). Szczepy zmutowane takiej aktywności nie posiadały. Dla porównania szczep dziki posiadający białka obu systemów nie pobudzał wytwarzania tlenku azotu przez makrofagi. Ta właściwość była warunkowana obecnością białka RecA, co oznacza, że białko RecA odgrywa ważną rolę w hamowaniu aktywności bakteriobójczej makrofagów. Uzyskane wyniki odniesione zostały do aktywacji ścieżki sygnałowej kinaz MAP, z udziałem białka ERK1/2, w kontroli wytwarzania RFT i NO oraz namnażania się prątków z lub bez białek systemu naprawy DNA. Wykazano, że białka obu systemów naprawczych hamują aktywność kinaz ERK1/2, przez co osłabiają działanie przeciwprątkowe komórek żernych. Ponownie wykazano, że szczególną rolę w tych procesach odgrywa białko RecA. **Czy zdaniem Doktorantki można zatem uznać to białko za jeden z kluczowych czynników chorobotwórczości prątków gruźlicy warunkujący ich przeżycie wewnątrz makrofagów poprzez modulację aktywności bakteriobójczej i cytokinowej tych komórek ? Czy w świecie drobnoustrojów znane są także inne przykłady zaangażowania białek naprawczych DNA w modulację funkcji komórek gospodarza przynoszące istotne korzyści czynnikowi zakaźnemu? Czy dostępne są wyniki badań, które by wskazywały jaka jest rola białek naprawczych HR oraz NHEJ prątków gruźlicy w modulacji aktywności makrofagów stymulowanych interferonem**

gamma (IFN-γ), który odgrywa kluczową rolę w nasilaniu aktywności bakteriobójczej makrofagów w odpowiedzi na zakażenie prątkami gruźlicy *in vivo*?

Wyniki własne Doktorantka szeroko przedyskutowała w końcowym rozdziale Dyskusja, odnosząc je do wyników innych autorów. Łącznie w pracy zacytowała 322 pozycje piśmiennictwa, głównie prace oryginalne z pokrewnej tematyki. Dyskusja została poprowadzona w sposób bardzo dojrzały.

Podsumowanie wyników zostało przedstawione w Streszczeniu. W mojej opinii powinno być bardziej zwarte.

Podsumowując przedstawioną mi do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Wybrany temat badawczy jest interesujący choć zarazem niełatwy. Wyniki zaprezentowane są źródłem wielu cennych informacji dotyczących możliwości modulacji aktywności makrofagów przez prątki gruźlicy za pośrednictwem białek naprawy DNA. Choć w chwili obecnej mają wartość badań podstawowych, to należy dostrzec możliwości aplikacyjne poczynionych obserwacji, w kontekście poszukiwania nowych leków przeciwprątkowych. Praca została dobrze przemyślana i starannie napisana. Przedstawione uwagi nie obniżają w żadnym stopniu wartości merytorycznej pracy. Wykonanie części doświadczalnej pracy wymagało od Doktorantki opanowania wielu technik badawczych. Wysiłek podjęty przez Doktorantkę i jego efekt w postaci przedłożonej mi do oceny monografii zasługują na wyróżnienie.

Przedkładam zatem Komisji do spraw Przyjmowania i Przeprowadzania Obron Rozpraw Doktorskich Instytutu Biologii Medycznej PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr Izabeli Szulc-Kiełbik do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie Doktorantki stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

KIEROWNIK
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ
prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela