



Prof. dr hab. E. K. Jagusztyn-Krynicka
UNIwersytet Warszawski

WYDZIAŁ BIOLOGII
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii

ul. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+48 22) 55-41-216, FAX: (+48 22) 55-41-402
e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Szulc-Kielbik „ Aktywność funkcjonalna makrofagów ludzkich zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* ze zinaaktywowanymi genami naprawy podwójnych pęknięć DNA”
Promotor – dr hab. Magdalena Klink

Rozprawa doktorska mgr Izabeli Szulc-Kielbik została wykonana w Pracowni Immunologii Doświadczalnej Instytutu Biologii Medycznej PAN pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Klink. Obiektem badań był patogenny mikroorganizm, czynnik etiologiczny gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*. Pomimo olbrzymiego postępu badań z zakresy biologii molekularnej, opracowania skutecznych, szybkich i tanich metod analiz globalnych komórek bakteryjnych nadal wiele aspektów patogenez *Mycobacterium tuberculosis* pozostaje niewyjaśnione i nadal nie dysponujemy skuteczną szczepionką anty-gruźliczą. Szczególnie daleko jest do całkowitego wyjaśnienia mechanizmów oddziaływań pomiędzy patogenem a organizmem gospodarza. I właśnie w nurt badań, mający na celu analizę tych aspektów patogenez wpisuje się przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska.

Rozprawa doktorska ma układ standardowy. Poza wstępem, rozdziałami opisującymi zastosowane materiały i metody, wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz ich dyskusję zawiera spis literatury (322 pozycje), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz podsumowanie wyników w którym doktorantka przedstawiła w punktach najistotniejsze według jej oceny osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej.

Wstęp do rozprawy wprowadza w tematykę badań. Chciałam podkreślić, że doktorantka stanęła wobec trudnego zadania - wyboru, które zagadnienia dotyczące różnych aspektów oddziaływań patogenu z makrofagami omówić, czy skoncentrować się na zagadnieniach „immunologicznych” czy też na omówieniu procesu patogenez „od strony” mikroorganizmu. Wybrała raczej ten pierwszy schemat działania. W mojej opinii zbyt skrótowo potraktowano podrozdział dotyczący czynników wirulencji, brak wzmianki o kilku istotnych czynnikach wirulencji, choćby aparacie sekrecyjnym ESX czy białkach PPE/PE, nie

mówiąc o analizach transkryptomycznych, które przeważnie kończą się długą listą genów, których produkty odgrywają, często nadal niewyjaśnioną, rolę w procesach patogenezy. Nie sugeruję wydłużania wstępów do rozpraw doktorskich, ale raczej skrótowego zasygnalizowania jak bardzo skomplikowane są to procesy.

Rozdział materiały i metody został opracowany starannie i z pewnością pozwoliłby na powtórzenie wykonanych eksperymentów. Mam niewielkie zastrzeżenia do opisu konstrukcji odpowiednich mutantów oraz szczepów do badania komplementacji danej mutacji przez dzikie kopie genów. Mutanty oraz szczepu użyte w eksperymentach komplementacyjnych nie były wykonane przez doktorantkę (rozprawa stanowi przykład perfekcyjnej współpracy genetyka z immunologiem). Tym niemniej w rozprawie należało podać czy dzikie kopie genu były kopiami plazmidowymi czy też zostały wintegrowane do chromosomu. Liczba kopii genu w eksperymentach komplementacyjnych jest istotna. Ryc.6AB obrazująca konstrukcję odpowiednich szczepów jest nieczytelna. Konieczne do zrozumienia dane odnalazłam w publikacji PLoS One z roku 2014.

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone niesłychanie starannie, z odpowiednimi eksperymentami kontrolnymi. Często poprzedzone one zostały badaniami wstępnymi w celu opracowania odpowiednich warunków przeprowadzenia eksperymentu właściwego. Doktorantka wykonała też odpowiednie analizy, ukazujące które z prezentowanych różnic są istotne statystycznie. W celu weryfikacji stawianych hipotez stosowano różnorodne strategie badawcze odpowiednio dobrane do rozwiązywanych zagadnień. Są to zarówno klasyczne metody mikrobiologiczne (wysiew bakterii na płytki), metody immunologiczne (oznaczanie poziomu cytokin, cytometria przepływowa, testy ELISA), biochemiczne (oznaczanie poziomu tlenu azotu, analiza poziomu fosforylacji białek) jak i metody biologii molekularnej (real time PCR). Każdy etap badań wymagał zastosowania innych strategii badawczych. Warsztat pracy został dobrany i opanowany przez doktorantkę perfekcyjnie.

Generalnie celem badań było ustalenie roli mechanizmów naprawy DNA (szlaków HR i NHEJ) w ochronie *Mtb* przed działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) oraz azotu (RFA), stanowiących kluczowy element nieswoistej odpowiedzi odpornościowej komórek gospodarza na zakażenie. We wszystkich eksperymentach stosowano szczep dziki i mutanty w pojedynczym systemie naprawy DNA (nie produkujące białka Ku i ligazy D lub białka RecA) lub mutanty z nieaktywnymi genami obu systemów. Dodatkowo w wielu eksperymentach celem wyjaśnienia roli receptorów makrofagowych w procesach niszczenia *MtB* stosowano dwie klasy bakterii – opsonizowane i nieopsonizowane. Przeprowadzono dwie grupy eksperymentów: pierwsza miała na celu wyjaśnienie oddziaływania

mechanizmów bójczych na *MtB*. a druga wpływ szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA *Mtb* na funkcjonowanie makrofagów. Poszczególne podrozdziały zawierają jasno sformułowane cele badawcze oraz krótkie podsumowanie uzyskanych wyników. W posumowaniu rozprawy zamieszczono tabelę obrazująca uzyskane dane eksperymentalne. Zaprezentowane w rozprawie dane eksperymentalne uwiarygodniły jak skomplikowane są badane szlaki oddziaływań, zarówno w komórce mikroorganizmu, jak i pomiędzy patogenem a gospodarzem. Generalnie doprowadziły one do wniosku, że białko RecA można uznać za czynnik wirulencji prątków *Mtb*.

Dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona w sposób profesjonalny w oparciu o dane literaturowe z ostatnich lat.

Mam kilka uwag. Poproszę doktorantkę o ustosunkowanie się do nich.

1. Na ile badania przeprowadzone z wykorzystaniem szczepu *Mtb* H37Rv, kliniczny izolat sprzed chyba około 100 lat, można odnosić do innych klinicznych izolatów często o dużo wyższym poziomie zjadliwości?
2. Jaka może być korelacja pomiędzy brakiem dwu badanych mechanizmów naprawy DNA a obniżeniem poziomu pobierania *Mtb* przez makrofagi ? Czy zmiana kształtu to wystarczające wyjaśnienie?
3. Dalszej eksperymentalnej analizy wymagają prawdopodobnie rozbieżności pomiędzy wynikami eksperymentów *in vitro* (brak wpływu czynników uszkadzających strukturę DNA na przeżywalność badanych szczepów) i *in vivo* (obniżenie przeżywalności potrójnego mutantu w makrofagach) Jak doktorantka zamierza zmodyfikować przeprowadzane eksperymenty?
4. Przeprowadzone badania sugerują, że białko RecA można uznać za czynnik wirulencji, czy analizowano zjadliwość badanych szczepów na modelu zwierzęcym?
5. Czy przeprowadzone badania mogą potencjalnie nieść aspekt aplikacyjny, czy białka badanych szlaków mogą być potencjalnie celem działania leków anty *Mtb*?
6. Czy jest możliwe w oparciu o badania dotyczące oddziaływań białek patogenu ze szlakami sygnalizacyjnymi makrofaga, zarówno własne jak i te dostępne w literaturze, przedstawienie potencjalnych szlaków oddziaływań i powiązań, które doprowadzają do zmian w poziomie uwalnianego czynnika TNF- α lub IL-10, czy oddziaływań badanych szlaków na fosforylację białek ERK1/2?

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Natknęłam się tylko na kilka niewłaściwych sformułowań lub nieścisłości. Wymieniam je z obowiązku recenzenta.

1. Ekspresji ulegają geny a nie białka ani mRNA. Tak więc sformułowanie „hamowanie ekspresji receptorów” czy ekspresja mRNA (str 126) jest niewłaściwe
2. Słowo sekwencja znaczy kolejność; powinno się pisać – sekwencja nukleotydowa lub sekwencja aminokwasowa
3. Wszystkie ryciny dotyczące analiz fosforylacji są niezbyt precyzyjnie opisane. Jaka jest różnica pomiędzy ścieżkami 1 i 2 oraz 4 i 5 ?

Podsumowując stwierdzam, że uznaję przedstawioną rozprawę doktorską za wartościową i spełniającą wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową, o czym świadczy logiczny ciąg przeprowadzonych eksperymentów dążących do wyjaśnienia stawianych celów badawczych jak i interpretacja uzyskanych wyników. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Molekularnej PAN o dopuszczenie mgr Izabeli Szulc-Kiełbik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wniosuję o nagrodzenie rozprawy stosowną nagrodą. Dane eksperymentalne uzyskane podczas wykonywania rozprawy doktorskiej zawarte zostały w dwu oryginalnych publikacjach naukowych – w PLoS One z roku 2014 i FEBS Journal (praca w recenzji).

E. K. Jagusztyn-Krynicka

Warszawa 20.12.2014

DYREKTOR
INSTYTUTU MIKROBIOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka