

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Widziołek-Pooranachandran pt. „*In vitro* and *in vivo* modelling of the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Widziołek-Pooranachandran została zrealizowana w laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy oraz w laboratorium Uniwersytetu w Sheffield pod kierunkiem prof. Craig'a Murdoch'a. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób przyzębia, ze szczególnym uwzględnieniem głównego czynnika etiologicznego tych chorób, czyli bakterii *Porphyromonas gingivalis*. Rozprawa doktorska to 162 strony drukowanego tekstu wraz z rysunkami i tabelami oraz załącznik w wersji elektronicznej. Zawiera ona wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo szczegółowe wprowadzenie do tematyki pracy badawczej, oparte o 305 pozycji literaturowych. Ta część pracy doktorskiej stanowi podstawę do przygotowania dobrej pracy przeglądowej, porządkującej aktualną wiedzę dotyczącą udziału czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis* w chorobach przyzębia, ze szczególnym uwzględnieniem gingipain. Co istotne, praca doktorska zawiera także opis nowego modelu badawczego, wykorzystanego po raz pierwszy przez Doktorantkę do badania patogenności bakterii *P. gingivalis*. Kolejne rozdziały, Materiały i metody, Wyniki oraz Dyskusja, pomimo zaprezentowania w nich ogromnej liczby metod i uzyskanych wyników, przedstawione są w sposób przejrzysty, umożliwiający właściwą ocenę pracy doktorskiej. Piśmiennictwo obejmuje 404 pozycje literaturowe, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego.

Głównym celem pracy doktorskiej była charakterystyka patogenności bakterii *P. gingivalis* w odniesieniu do ich udziału w rozwoju chorób układuowych. Szczegółowe cele obejmowały badania nad oddziaływaniem bakterii ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych

oraz komórkami układu immunologicznego gospodarza, a także nad rolę wybranych składników sekrecyjnego systemu T9SS w oddziaływaniu bakterii *P. gingivalis* z komórkami gospodarza. Do realizacji celu pracy doktorskiej mgr Magdalena Widziołek-Pooranachandran wykorzystwała różnorodne doświadczenia, w tym badania *in vivo* przeprowadzone na nowym modelu badawczym z wykorzystaniem danio pręgowanego oraz badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek układu immunologicznego oraz komórek śródbłonna. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane.

W rozdziale Materiały i metody mgr Magdalena Widziołek-Pooranachandran szczegółowo i w sposób przejrzysty przedstawiła odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane podczas realizacji pracy doktorskiej. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie i szczegółowy opis podstaw badania patogenności bakterii *P. gingivalis* z wykorzystaniem nowego modelu badawczego w oparciu o danio pręgowane. Świadczy to nie tylko o pracowitości Doktorantki, która poprzez realizację tego aspektu pracy doktorskiej dała podstawy do dalszych badań, ale przede wszystkim o determinacji w zgłębianiu wiedzy i dążeniu do nowych odkryć. Zastosowanie interdyscyplinarnych metod i technik, m.in. z zakresu biologii molekularnej, biochemii, mikrobiologii, hodowli bakteryjnych i komórkowych, mikroskopii, doświadczeń wykonanych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, świadczy nie tylko o dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki, która do realizacji postawionych zadań potrafi sama dobrać lub zastosować wskazane przez innych odpowiednie metody badawcze, ale także o nabytych, szerokich umiejętnościach praktycznych. Wartościowe jest także prowadzenie badań w kilku ośrodkach naukowych, umożliwiające wykorzystanie nie tylko dostępnych w nich sprzętów i technik, ale także skorzystanie z wiedzy osób w nich pracujących. Z pewnością wpłynęło to korzystnie na wartość uzyskanych wyników, o czym świadczy już opublikowana praca, zawierająca część wyników pracy doktorskiej.

W obszernym rozdziale Wyniki, uzupełnionym przez dane zawarte w załączniku w wersji elektronicznej, Recenzent nie zauważył błędów merytorycznych, a uzyskane wyniki są przedstawione w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Każdy z rozdziałów kończy się krótkim podsumowaniem, co ułatwia ocenę tak dużej liczby wyników. Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw patogenności bakterii *P. gingivalis*. Co istotne, część z tych wyników została już opublikowana, czyli została poddana dogłębnej ocenie przez specjalistycznych recenzentów czasopisma *Scientific Reports* (5-letni IF=4,796). Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent

zalicza opracowanie podstaw nowego modelu badawczego chorób przyzębia z wykorzystaniem danio pręgowanego wraz z nowoczesnymi technikami mikroskopowymi, umożliwiającymi ocenę oddziaływania patogen-gospodarz w czasie rzeczywistym, zwłaszcza w odniesieniu do udziału bakterii *P. gingivalis* w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Na szczególną uwagę zdaniem Recenzenta zasługują następujące osiągnięcia:

- 1) Potwierdzenie różnic w wirulencji szczepów bakterii *P. gingivalis* z wykorzystaniem nowego modelu badawczego; pomimo, iż takie różnice opisano już wcześniej, Doktorantka wykazuje je po raz pierwszy w nowym modelu badawczym, dając tym samym podstawy do dalszych badań;
- 2) Potwierdzenie istotnego udziału gingipain, zarówno w formie aktywnych enzymów, jak i nieaktywnych enzymatycznie białek, posiadających domeny HA, jako głównego czynnika wirulencji bakterii *P. gingivalis* w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych; takie dane zostały już w dużej części opublikowane, ale Doktorantka po raz pierwszy przedstawia je w nowym modelu badawczym, opracowując w ten sposób podstawy do dalszych doświadczeń;
- 3) Wykazanie udziału gingipain w przeżywaniu bakterii *P. gingivalis* w komórkach układu immunologicznego danio pręgowanego oraz ich rozprzestrzeniania się w badanym organizmie; wiele doniesień naukowych wskazuje na istotność gingipain w tym aspekcie, ale wyniki uzyskane w tej pracy doktorskiej gruntują te doniesienia i umożliwiają dalsze szczegółowe badania;
- 4) Wykazanie mechanizmu oddziaływania bakterii *P. gingivalis* z komórkami śródbłonna w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek oraz *in vivo* z wykorzystaniem danio pręgowanego, również w formie zmodyfikowanych, transgenicznych organizmów; wyniki uzyskane z tych doświadczeń stanowią dobrą podstawę do przedstawienia bardzo prawdopodobnej hipotezy mechanizmu destrukcyjnego działania gingipain na komórki śródbłonna naczyń, prowadzącego w efekcie końcowym do zaawansowania chorób układu sercowo-naczyniowego;
- 5) Wykazanie wyższości modelu z wykorzystaniem danio pręgowanego nad innymi modelami w badaniach nad udziałem bakterii *P. gingivalis* w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, a także zaangażowania w ten proces gingipain;
- 6) Wykazanie udziału składników sekrecyjnego systemu T9SS, ze szczególnym uwzględnieniem białka Sov, w unikaniu przez bakterie *P. gingivalis* efektywnego działania komórek układu immunologicznego gospodarza, w tym fagocytozy i

wewnątrzkomórkowej eliminacji w modelu *in vitro* z wykorzystaniem komórek oraz *in vivo* z wykorzystaniem danio pręgowanego.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka krytycznie ocenia uzyskane wyniki i ich potencjalne znaczenie, szeroko odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Pomimo przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników oraz dogłębnej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu poszerzenie dyskusji zawartej w pracy doktorskiej:

- 1) Doktorantka opisuje wprawdzie główne zalety i wady nowego modelu badawczego, ale Recenzent nadal ma wątpliwości dotyczące wykorzystania go w badaniach odpowiedzi immunologicznej człowieka na obecność bakterii *P. gingivalis*. Dlatego też, prosi o bardziej szczegółowe wyjaśnienie najważniejszych ograniczeń podczas oceny stopnia zaawansowania infekcji wywołanych przez bakterie *P. gingivalis* także w rozwoju innych chorób układowych w porównaniu do badań z wykorzystaniem modelu mysiego oraz komórek człowieka ?
- 2) Analiza oddziaływania bakterii *P. gingivalis* z makrofagami została przedstawiona w modelu *in vitro* na komórkach linii RAW 264.7. Jak sama Doktorantka zaznacza, oddziaływanie bakterii z komórkami gospodarza było specyficzne dla makrofagów (Rys. 34), gdyż nie zaobserwowano różnic w oddziaływaniu z keratynocytami. W dalszych doświadczeniach wykazano różnice w produkcji wybranych cytokin przez makrofagi (Rys. 38). Dane literaturowe pokazują, że w oddziaływaniu bakterii z makrofagami, w tym także bakterii *P. gingivalis*, istotne jest pochodzenie makrofagów oraz ich polaryzacja. Czy w badaniach wstępnych scharakteryzowano fenotyp makrofagów i czy wykorzystano inne makrofagi ?
- 3) Doświadczenia, w których wykorzystano znakowane fluorescencyjnie bakterie *P. gingivalis*, pozwalają na obserwację znakowanych bakterii w komórkach gospodarza (m.in. bakterie przygotowane według protokołów opisanych w rozdziale 7.2.18 i 7.2.20). Czy w takich doświadczeniach można tak samo oceniać nowe komórki bakteryjne, replikujące się w komórkach gospodarza ?
- 4) Czy opracowany nowy model badań *in vivo* z wykorzystaniem szczepu bardziej i mniej wirulentnego umożliwi stwierdzenie, które geny - ich obecność lub brak w tych szczepach - mogą być odpowiedzialne za te różnice ? Czy tylko fimbrie ?
- 5) Bakterie *P. gingivalis* w postaci zmodyfikowanego szczepu $\Delta K/R$ -ab (szczep pozbawiony możliwości produkcji gingipain) mają większą tendencję do tworzenia

agregatów w porównaniu z pozostałymi badanymi szczepami (Rys. 30 D i 30D', str. 108; SEM). Jednak na Rys. 31 (str. 109; TEM) taki efekt jest już dużo mniej widoczny. Czy za ten efekt odpowiada tylko fizyczny brak gingipain lub białka Sov w mutantach bakterii *P. gingivalis* i spowodowana tym zmiana struktury i właściwości błony zewnętrznej ?

- 6) Jakie mogą być przyczyny faktu, że brak aktywnego genu *sov* zmienia architekturę błony zewnętrznej (co jest częściowo zrozumiałe ze względu na brak stosunkowo dużego białka w strukturze tej błony), ale nie wpływa na produkcję pęcherzyków błony zewnętrznej ?

Pod względem merytorycznym i edytorskim praca doktorska jest napisana bardzo dobrze, a nieliczne błędy edytorskie i językowe oraz niejednolity styl przedstawienia pozycji literaturowych nie wpływają na jej wartość merytoryczną. Dlatego też, Recenzent nie wymienia ich szczegółowo, zwłaszcza, że w części zostały one już zauważone i nie pojawiły się w opublikowanej pracy. Poza tym, praca doktorska napisana jest w języku angielskim, dlatego też Recenzent nie przytacza konkretnych przykładów, pozostawiając ten aspekt osobom bardziej kompetentnym.

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Magdaleny Widziołek-Pooranachandran nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 3 prace, w tym pracę zawierającą część wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w pracy doktorskiej i opublikowanej pracy oraz pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Widziołek-Pooranachandran pod względem naukowym całkowicie spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami z dnia 30 października 2015 roku. Dlatego też, wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz opublikowanie już części wyników w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Widziołek-Pooranachandran stosowną nagrodą.

