



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 Danuty Bryzek „Indukcja nieaktywnych bakteriobójczo zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) przez gingipainy, jako nowy mechanizm wirulencji *Porphyromonas gingivalis*”

Promotor prof dr hab. Jan Potempa

Porphyromonas gingivalis to gram ujemna pałeczka należąca do typu *Bacteroidetes*, jeden z trzech gatunków mikroorganizmów składników tzw, czerwonego kompleksu grupującego czynniki etiologiczne paratodozy, przewlekłego zapalenia przyzębia. Wiele aspektów patogenyzy indukowanych przez *P. gingivalis* jest od kilku lat szczegółowo badanych w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w grupie badawczej kierowanej przez prof. dr hab. Jana. Potempę. W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr Danuta Bryzek analizowała rolę zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych w procesie rozwoju paradontozy. Te wytwarzane przez neutrofile antybakteryjne sieci zbudowane z chromatyny oraz wielu białek ziarnistości neutrofili, stanowią istotny element aktywności wrodzonego układu odpornościowego doprowadzający do ograniczenia rozprzestrzeniania się infekcji. Jednocześnie mikroorganizmy patogenne wytworzyły wiele mechanizmów obronnych chroniących je przed antybakteryjną aktywnością pułapek neutrofilowych. Zagadnienia te są jak dotąd niezbyt dokładnie poznane. Celem badań prowadzonych przez mgr Danute Bryzek było określenie roli gingipain, zewnątrzkomórkowych cysteinowych proteaz *P. gingivalis* w ochronie patogenu przed aktywnością pułapek neutrofilowych.

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

Wstęp do rozprawy, podzielony na szereg właściwie dobranych podrozdziałów wprowadza w tematykę badań. Jego opracowanie nie było łatwym zadaniem, bowiem

wymagało od doktorantki głębokiej, a nie pobieżnej, wiedzy zarówno z dziedziny mikrobiologii jak i immunologii. Skomplikowane zagadnienia oddziaływań pomiędzy bakteriami patogennymi a układem immunologicznym przedstawione zostały w sposób przejrzysty, zrozumiały nawet dla osób nie będących ekspertami w omawianej dziedzinie mikrobiologii. W mojej opinii wstęp do rozprawy doktorskiej mógłby być opublikowany w czasopiśmie „Postępy Mikrobiologii” i stanowić dobre źródło wiedzy dla studentów czy mikrobiologów zatrudnionych w służbie zdrowia.

W pierwszym etapie badań doktorantka analizowała rolę poszczególnych gingipain w tworzeniu pułapek neutrofilowych *in vitro*. Ten etap to logiczny ciąg eksperymentów wykonany przy użyciu odpowiednio dobranych metod, który doprowadził do wykazania, że najistotniejszą rolę w indukcji tworzenia pułapek neutrofilowych odgrywa argininowa gingipaina HRgpA. Analizowano indukcję generowania pułapek neutrofilowych zarówno przez szczep dziki *P.gingivalis*, mutanta pozbawionego genów kodujących badane enzymy, oczyszczone enzymy jak i pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV) zawierające badane enzymy. Eksperymenty, w których mierzono ilość uwalnianego DNA uzupełniono analizami z użyciem odpowiednich induktorów. Dane eksperymentalne przedstawione zostały w postaci wykresów opatrzonych odpowiednimi analizami statystycznymi. Dodatkowo uzupełniono je analizami mikroskopowymi określającymi strukturę sieci NET. Doktorantka wykazała istotne różnice w strukturze sieci w zależności od czynnika indukującego ich powstanie. Poszczególne podrozdziały opatrzone są przeważnie kilkoma zdaniami wstępu uzasadniającymi cel konkretnego doświadczenia czy przedstawiającymi hipotezę badawczą. Taki sposób przedstawienia wyników w znaczący sposób ułatwia śledzenie kolejnych etapów badań. Następny etap pracy miał na celu analizę mechanizmów działania gingipain. Wykazano, że indukują one procesy wybuchu tlenowego w sposób zależny od oksydazy NADHP.

Eksperymenty *in vitro* następnie uzupełniono eksperymentami przeprowadzonymi *in vivo*. Potwierdziły one zdolność gingipain do indukcji wytwarzania NET na modelu mysim. Eksperyment wykonany został z zastosowaniem dwu linii myszy C57 i Balb/c. Wynik pozytywny otrzymano tylko w wypadku myszy C57. Oczekiwałabym wyjaśnienia tego zjawiska. Eksperyment udokumentował, że proces tworzenia NET pod wpływem gingipain nie ogranicza się do ludzkich neutrofilów, co podkreślono w podsumowaniu badań.

Dalszy fragment pracy to eksperymenty które wykazały, że zdolność do indukcji wytwarzania NET nie ogranicza się jedynie do mikroorganizmu *Porphyromona gingivalis* a jest prawdopodobnie charakterystyczna dla wielu bakterii patogennych. W tym

eksperymentach przeanalizowano indukcję wytwarzania NET przez kilka białek *Staphylococcus aureus* wykazując, że jedno z nich, aureolizyna, indukuje powstawanie pułapek neutrofilowych.

Istotnym elementem pracy były eksperymenty mające na celu wyjaśnienie aktywności bakteriobójczej wytwarzanych pod wpływem gingipain sieci neutrofilowych. Doktorantka wykazała, że gingipainy modulując skład białkowy sieci NET w znaczącym stopniu ograniczają ich właściwości bakteriobójcze. Ten eksperyment jak i wstępne określenie potencjalnych receptorów neutrofilii rozpoznawanych przez gingipainy otwierają drogę do dalszych badań.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska udokumentowała nowy mechanizm działania zewnątrzkomórkowych proteaz bakteryjnych, w tym wypadku gingipain, będących istotnym elementem obrony mikroorganizmu przed działalnością wrodzonego układu odpornościowego. Modulując skład białkowy pułapek neutrofilowych i indukując zjawisko netozy w znaczący sposób ograniczają ich aktywność antybakteryjną.

Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób profesjonalny w oparciu o dostępne dane literaturowe. Wyjaśnia obserwowane różnice w aktywności pomiędzy szczepami *P. gingivalis* czy różnice w intensywności tworzenia NET pomiędzy badanymi gingipainami. Za najciekawsze uważam ostatnie rozdziały dyskusji omawiające ewentualną rolę receptorów PAR oraz potencjalne, jeszcze dokładnie nie przebadane, strategie modulowania struktury i składu białkowego NET wypracowane przez patogen dla obrony przed antybakteryjnym działaniem pułapek neutrofilowych. Nakreślają one kierunki dalszych badań.

Uwagi:

Na wielu rycinach przedstawiono wyniki eksperymentów jako zależność tworzenia NET od wielu czynników mierzoną ilością uwalnianego DNA. Na osi rzędnych podano dane w postaci RFU (względna jednostka fluorescencji). Wyjaśnienia tego skrótu podano jedynie w tabeli skrótów, powinno też znaleźć się w opisie pod rycinami. Ryciny winny być czytelne bez konieczności poszukiwania objaśnień w innym fragmencie pracy.

Czy gingipainy są antygenami? (str 59)

W eksperymencie analizy aktywności OMV zastosowano neutrofile pochodzące od pięciu dawców. Jakie były kryteria doboru dawców, czy były różnice w odniesieniu do neutrofilii pochodzących od różnych dawców?

Doktorantka w tekście podaje, że analizowała rolę LPSu i fimbrii w powstawaniu NET. W podpisie pod ryciną nr 9 podano użycie białka FimA a nie całych fimbrii. W

podrozdziale materiały i metody nie znalazłam metod oczyszczania LPSu i białka FimA. Podobnie brak jest podanej metodyki oczyszczania gingipain i białek *Staphylococcus aureus* stosowanych w eksperymentach. Rozumiem, że są to metody rutynowo stosowane w laboratorium, ale należało podać odnośniki do odpowiednich publikacji.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka błędów stylistycznych, które udało mi się zauważyć.

Sformułowania - szczep pozbawiony ekspresji gingipain (str 59) czy ekspresji proteaz (str 60) są żargonem laboratoryjnym – ekspresji ulegają geny – winno być - szczep pozbawiony ekspresji genów kodujących gingipainy/proteazy

Czynniki wirulencji lepiej opisać jako wydzielane a nie sekrecjonowane.

Sformułowanie mutant gingipain czy mutant aureolizyny jest też żargonem laboratoryjnym – winno być mutant w genie kodującym gingipainę

Słowo sekwencja znaczy kolejność – w kilku miejscach rozprawy np. str 55 winno być sekwencja aminokwasowa

Podsumowując wyraźnie chciałam podkreślić wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań oraz staranność opracowania ich wyników. Bezspornie pogłębiły one wiedzę dotyczącą mechanizmów wirulencji *P. gingivalis*. Równocześnie mogą przyczynić się do opracowania nowych skutecznych metod terapeutycznych. Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr Danuty Bryzek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uznaję rozprawę doktorską za godną nagrodzenia pod warunkiem opublikowania prezentowanych danych eksperymentalnych.

E. K. Jagusztyn-Krynicka

Warszawa 07.09.2015

DYREKTOR
INSTYTUTU MIKROBIOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka