Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii
Zakład Biochemii

Ul. F. Joliot-Curie 14A
50-383 Wrocław

Prof. dr hab. Teresa Olczak
Tel. 71 3752 612
E-mail: Teresa.Olczak@biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 14.08.2015 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Danuty Bryzek pt. „Indukcja nieaktywnych bakteriobójczo zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) przez gingipainy, jako nowy mechanizm wirulencji *Porphyromonas gingivalis*"

Rozprawa doktorska mgr Danuty Bryzek została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy oraz dr Joanny Kozieł. Promotor Doktorantki, ko-promotor oraz członkowie Zakładu Mikrobiologii, kierowanego przez prof. Potempę, od wielu lat zajmują się badaniem podstaw chorób przyzębia. Jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za zapoczątkowanie, rozwój oraz skutki przewlekłych chorób przyzębia są gingipainy, czyli proteazy cysteinowe wytwarzane przez bakterie *P. gingivalis*. Poprzez realizację pracy doktorskiej, Doktorantka znacząco przyczyniła się do zwiększenia osiągnięć naukowych tej grupy badawczej. Należy tutaj podkreślić, iż tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę dotyczy jednego z ważnych aspektów zdrowia człowieka, gdyż choroby przyzębia zaliczane są do powszechnych chorób infekcyjnych mających wpływ nie tylko na stan jamy ustnej, ale także na ogólny stan zdrowia. Biorąc pod uwagę znaczenie chorób przyzębia także w rozwoju schorzeń układowych, nasilającą się oporność na stosowane antybiotyki oraz wzrastające koszty leczenia, charakterystyka podstawowych mechanizmów bakteryjnej wirulencji wykorzystywanych przez patogeny jamy ustnej, a zwłaszcza *P. gingivalis* należy do ważnych aspektów nauk medycznych oraz ochrony zdrowia.

Rozprawa doktorska liczy 110 stron i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac. Doktorantka wprowadza czytelnika w swoją pracę spisem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki pracy badawczej, zwłaszcza dla osób, które na co dzień nie zajmują się immunologią. Doktorantka przedstawia w nim znaczenie neutrofili w procesie zwalczania infekcji, opisuje antybakteryjne mechanizmy obronne stosowane przez neutrofile oraz przedstawia znane z literatury fakty dotyczące zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych, czyli NETs. We wstępie zostały szczegółowo przedstawione mechanizmy patogenów stosowane w zwalczaniu NETs oraz zewnątrzkomórkowe pułapki układu odpornościowego o pochodzeniu innym niż neutrofilowe. Doktorantka opisuje także znaczenie NETs w chorobach niezakaźnych. Część wstępu została poświęcona opisowi chorób przyzębia oraz bakteriom *P. gingivalis* i czynnikom wirulencji wykorzystywanym przez te bakterie, ze szczególnym uwzględnieniem gingipain. W końcowej części wstępu znajdują się również aktualne dane dotyczące udziału NETs w chorobach przyzębia. Warto tutaj zaznaczyć, że do tej pory nie ma zbyt wielu doniesień na ten temat.

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej przedstawiła 5 głównych celów badawczych, które zdaniem Recenzenta zostały zrealizowane. W rozdziale Materiały i metody zostały szczegółowo przedstawione odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane

w pracy doktorskiej. Są one na tyle dokładnie opisane (z małymi wątpliwościami zaznaczonymi poniżej), że niniejsza rozprawa może stanowić dobrą podstawę do ich wykorzystania przez młodszych badaczy. Doktorantka zastosowała nie tylko metody mikrobiologiczne i biochemiczne, ale także zaawansowane techniki mikroskopowe. Do realizacji założonych celów Doktorantka wykorzystała dwa główne modele badawcze, w tym jeden z wykorzystaniem ludzkich neutrofili, a drugi z wykorzystaniem neutrofili pobranych z płynu wysiękowego myszy. W badaniach zastosowano nie tylko szczepy dzikie wybranych bakterii, ale także odpowiednie mutanty.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały ewidentny udział bakterii *P. gingivalis* w tworzeniu NETs, procesie zależnym przede wszystkim od produkcji gingipain. Co ciekawe, Doktorantka wykazała, że gingipainy jednocześnie ograniczają wychwytywanie bakterii *P. gingivalis* przez NETs. Uzyskane wyniki udowodniły, że także wydzielone pęcherzyki powstające z błony zewnętrznej bakterii oraz oczyszczone gingipainy, a zwłaszcza HRgpA, mogą inicjować tworzenie NETs, a proces ten jest zależny głównie od ich aktywności enzymatycznej. Co więcej, tworzenie NETs w odpowiedzi na gingipainy nie ma właściwości antybakteryjnych wobec bakterii *P. gingivalis*, co potwierdza dodatkowe przystosowanie tych bakterii do przeżycia w niekorzystnym środowisku gospodarza. Doświadczenia mające na celu wyjaśnienie podstaw zachodzących procesów wykazały, że tworzenie NETs przy udziale gingipain jest zależne od aktywacji NADPH, tworzenia reaktywnych form tlenu oraz prawdopodobnie zaangażowania receptorów PAR. Doktorantka wykazała również, że tzw. proces NETozy może być inicjowany nie tylko przez gingipainy bakterii *P. gingivalis*, ale także przez inne protezy, m.in. przez aureolizynę bakterii *Staphylococcus aureus*.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka krytycznie ocenia swoje wyniki i ich potencjalne znaczenie oraz odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze. Wydaje się, że czasami dyskusja jest zbyt daleko posunięta i nie dotyczy zakresu pracy doktorskiej. Ma to miejsce m.in. w przypadku omawiania potencjalnego znaczenia peptydu LL-37 i udziału procesu cytrulinacji w jego modyfikacji, co może wpływać na zawartość, strukturę i właściwości NETs. Jednakże zdaniem Recenzenta jest to raczej zaleta, aniżeli wada, świadcząca o obszernej wiedzy Doktorantki, która może zostać wykorzystana w realizacji kolejnych doświadczeń. Dyskusję zamykają wnioski końcowe, bardzo dobrze podsumowujące efekty uzyskane w pracy doktorskiej.

Piśmiennictwo obejmuje 199 prac, z czego większość to doniesienia z ostatnich lat. Jest to lista, która pozwala na wyczerpujące przedstawienie badanego problemu. W pracy doktorskiej znajduje się także odniesienie do niektórych wyników zaprezentowanych w pracy doktorskiej J. L. Palmer z 2010 roku, której wyniki jednak nigdy nie zostały opublikowane.

Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, Recenzent wnioskuje, że mgr Danuta Bryzek do realizacji prowadzonych badań wykorzystała szeroki wachlarz nowoczesnych metod badawczych, dobrze dobranych do rozwiązania postawionych problemów badawczych. Doktorantka korzysta także ze specjalistycznej pomocy innych osób przy wykorzystaniu niektórych technik, co zostało jednoznacznie zaznaczone w rozprawie doktorskiej. Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna większość to wyniki nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę charakterystyki patogenezy chorób przyzębia. Istotne jest także potencjalne powiązanie uzyskanych wyników nie tylko z chorobami przyzębia, ale także z chorobami układowymi. Uzyskane wyniki są interesujące nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale mogą one także dostarczyć informacji

dla badaczy poszukujących nowych celów do opracowania w przyszłości nowej generacji metod antybakteryjnych, stosowanych w zapobieganiu i leczeniu chorób przyzębia.

Pod względem edytorskim praca jest napisana bardzo dobrze, a drobne błędy nie mają istotnego znaczenia. Troszkę może jedynie razi i czasami przeszkadza w płynnym czytaniu nadmierne używanie przecinków lub używanie dwukropka w nieodpowiednich miejscach. W pracy można też znaleźć niefortunne zwroty, takie jak .."utrwalone szkiełka..." Natomiast z obowiązku Recenzent pragnie zwrócić uwagę na dosłowne tłumaczenie wyrazów z języka angielskiego, co jest istotne nie tyle z punktu widzenia czytanej pracy, ale dla przyszłości młodego badacza, który może być wkrótce nauczycielem akademickim. Recenzent nie wymienia wszystkich uwag, ale jako przykład mogą służyć zwroty ze strony 14 „Egzekucję procesu fagocytozy rozpoczyna ...", ze strony 24 „.. aktywacja neutrofili mediowana...„ , czy też zwrot ze strony 78 „...indukcja NETs mediowana działaniem gingipain skutkuje eradykacją patogenu." Zastanawiające jest też stosowanie nomenklatury „parodontoza" i „paradontoza" zamiennie oraz niejednolitej nomenklatury gingipain. W całej pracy wykorzystane jest także wykorzystanie litery „x" zamiast symbolu „×" w opisie szybkości wirowania lub podawania rzędu liczby komórek, a także formułowania czasu w postaci „12h" zamiast „12 godzin" lub w skrócie „12 godz.". Część tych uwag dotyczy nie tylko prac pisanych w języku polskim, ale też angielskim, co można sprawdzić w wytycznych dla autorów zamieszczonych w czasopismach naukowych. Nie są to liczne niedoskonałości, ale Recenzent zwraca na nie uwagę ze względu na zachowanie poprawności pisania prac naukowych.

Pewnym niedosytem dla czytającego jest także brak szczegółowego opisu osi na niektórych rysunkach i podawanie tylko skrótów („RFU" na Rysunku 16A na stronie 77 i na wielu innych wykresach oraz „MFI" na Rysunku 14, a wystarczyłoby ich rozwinięcie w opisie rysunków, „min/ml" na Rysunku 16B na stronie 77, prawdopodobnie wynikające z błędnego wprowadzenia oznaczenia w programie). Lepsze zrozumienie uzyskanych wyników ułatwiłoby także przedstawienie wyników pomiaru NETs poprzez analizę ilości DNA razem z wynikami uzyskanymi z analizy mikroskopowej w jednym rozdziale. W opisie Rysunku 10B (strona 69) brak jest oznaczenia niektórych paneli z wynikami z doświadczeń przy użyciu mieszaniny gingipain. Także zdanie na stronie 90 „Jako potencjalny mechanizm przekazu sygnału mediowany domeną hemaglutynująco/adhezyjną wskazano oddziaływanie z receptorami Toll-podobnymi, które występują na powierzchni zróżnicowanych makrofagów, w tym TLR-2 i TLR-7." jest nieprecyzyjne i Recenzent prosi o odpowiednie wyjaśnienia.

Pomimo uzyskania wielu cennych wyników pewnym niedosytem jest fakt, że ludzkie neutrofile pobrano od osób zdrowych, a mysie neutrofile pochodziły z płynu wysiękowego, co nie pozwala na analizę porównawczą właściwości tych komórek. O ile takie badania nie były przeprowadzone, być może wykorzystanie neutrofili krwi obwodowej zdrowych myszy mogłoby pomóc w wyjaśnieniu różnic występujących między zwierzętami modelowymi oraz człowiekiem. Wszystkie wymienione powyżej drobne uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, ale Recenzent ma nadzieję, że będą one uwzględnione przez młodego badacza w pracach wykonywanych i pisanych w przyszłości.

Pomimo obszernej i bardzo dobrej dyskusji zamieszczonej w pracy doktorskiej, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do pytań, nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej:

1) Jaki wpływ pośrednio na wirulencję, a bezpośrednio na strukturę i funkcję komórki bakterii *P. gingivalis* może mieć usunięcie w sensie ilościowym i jakościowym z ich komórek 3 bardzo ważnych białek, jakimi są gingipainy ?

2) Czy metoda wykorzystana w pracy doktorskiej do ilościowej oceny DNA występującego w NETs, a polegająca na zbieraniu „nadsączu znad komórk neutrofili" jest wystarczająca do oddzielenia tych struktur od komórek ? Jak to można odnieść do analizy NETs z wykorzystaniem technik mikroskopowych ?
3) Czy zdaniem Doktorantki NETs powstające na skutek działania gingipain są nieaktywne bakteriobójczo tylko wobec *P. gingivalis*, czy też jest to efekt obejmujący inne bakterie ? Czy były analizowane np. inne bakterie wchodzące w skład biofilmu jamy ustnej, biorące udział w rozwoju chorób przyzębia ?
4) Z czego mogą wynikać różnice w wirulencji pomiędzy szczepem W83 i ATCC 33277, z wyjątkiem przykładów podanych w pracy doktorskiej ? Czy były wykonywane podobne doświadczenia, jak te zaprezentowane w pracy dokotrskiej z wykorzystaniem szczepu ATCC 33277 ?
5) Czy istnieją dane porównawcze na temat tworzenia NETs przez neutrofile pobrane z krwi obwodowej osób zdrowych i chorych ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Danuty Bryzek nie można jednak pominąć pozostałego dorobku naukowego, który obejmuje 4 prace opublikowane w renomowanych czasopismach, z istotnym udziałem Doktorantki. Dlatego też, w podsumowaniu stwierdzam, że wyniki przedstawione w pracy doktorskiej mgr Danuty Bryzek oraz pozostały dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej i przedstawiony w opublikowanych pracach, oceniam bardzo wysoko. Uzyskane samodzielnie lub we współpracy wyniki są niezwykle cenne, przede wszystkim ze względu na to, że są to nowe dane naukowe, wnoszące do nauki charakterystykę nowych procesów. Recenzent ma nadzieję, że już wkrótce ukażą się one w postaci opublikowanych prac.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Danuty Bryzek pod względem naukowym 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. Dlatego też, z ogromną przyjemnością 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 wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Danuty Bryzek stosowną nagrodą.

Teresa Olczak