



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfeldta

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości: IMMUNE

2015 07. 02

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71

<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

dr. hab Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii

Tel. 071-3709949

e-mail: zawilak@iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 02. 07. 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Leszczyńskiej pt.: " Wpływ czynników hamujących lub indukujących wewnątrzkomórkową agregację białek na powstawanie bakterii tolerujących antybiotyki"

Rozprawa doktorska mgr Darii Leszczyńskiej dotyczy problemu bakterii „przetrwałych” (ang. *persisters*), czyli bakterii zdolnych przetrwać działanie antybiotyków na zasadzie innej niż klasyczna lekooporność uwarunkowana genetycznie. Bakterie „przetrwałe” zwykle stanowią nieliczną część populacji. Ich powstawanie, trwanie i wybudzenie ze stanu warunkującego antybiotykooporność stanowi nie tylko ciekawy temat badawczy, ale przede wszystkim poważny problem medyczny, ponieważ bakterie te mogą być źródłem nawrotu infekcji po zakończeniu antybiotykoterapii. Rozwój nowoczesnych technik badawczych, w szczególności tych umożliwiających analizowanie pojedynczych komórek w populacji, spowodował w ostatnich latach zintensyfikowanie prac badawczych nad komórkami „przetrwałymi”. W tym świetle badania Pani mgr Leszczyńskiej wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych prac naukowych.

Rozprawa mgr Darii Leszczyńskiej ma formę klasyczną. Jest napisana poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawione są zagadnienia teoretyczne jak i wyniki badań. We Wstępie Doktorantka zwięźle ale wyczerpująco wprowadza w zagadnienia związane zarówno z komórkami „przetrwałymi” jak i związkami opiekuńczymi. W rozdziale „Cel Pracy” jasno precyzuje założenia badawcze. Rozdział „Materiały i Metody” jest krótki, ale opisy w nim zawarte są dość precyzyjne (uwagi na str. 4 Recenzji). Rozdział „Wyniki” a następnie „Dyskusja” stanowią główną część pracy omówioną poniżej. Całość dopełniają streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz spis literatury. Brakowało mi jednak rozdziału „Wnioski”, który zwykle zwieńcza dzieło. Podsumowując ocenę formalną pracy – rozprawa jest przygotowana starannie i rzetelnie, umożliwia zapoznanie się z dorobkiem Doktorantki.

Celem pracy podjętej przez Doktorantkę było określenie zależności między powstawaniem bakterii „przetrwałych” a agregacją białek w komórkach bakteryjnych w hodowli *Escherichia coli* w fazie stacjonarnej i starzeniem się komórek. Genezą podjętych badań była zaobserwowana korelacja wyników prac badawczych wskazujących na zwiększoną agregację białek oraz większą

liczbę komórek „przetrwałych” w hodowlach w fazie stacjonarnej w stosunku do hodowli w fazie logarytmicznej. Doktorantka w swoich badaniach modulowała agregację białek w komórkach bakterii dodając do pożywek związki wpływające na agregację białek (4 związki osmolityczne, MOPS i octan sodu), a następnie badała powstawanie komórek „przetrwałych” w zależności od poziomu agregacji białek w komórkach hodowli. W badaniach nad dzikim szczepem *E. coli* MC4100 doktorantka wykazała, że w hodowlach, w których zwiększano agregację białek działając octanem sodu oraz osmolitami w stosunkowo wysokich stężeniach, zwiększony był udział bakterii „przetrwałych” w stosunku do hodowli kontrolnej, w której zachowano naturalny poziom agregacji białek w danej fazie wzrostu. Natomiast w hodowlach, w których agregacja białek była zmniejszona w stosunku do hodowli kontrolnej (np. przez działanie MOPS lub osmolitów w stosunkowo niskich stężeniach) obserwowano mniejszą liczbę komórek „przetrwałych”. Tym samym doktorantka potwierdziła zależność zwiększonej częstości tworzenia komórek „przetrwałych” ze wzrostem poziomu agregacji białek w hodowlach *E. coli* MC4100. Jak wykazała Doktorantka efekt ten nie był bezpośrednio związany ze starzeniem się komórek, ponieważ nie znaleziono korelacji z takimi markerami starzenia jak zmiana poziomu utlenienia białek, stężenia ATP i liczby komórek VBNC. Doktorantka wykazała ponadto, że związki zmniejszające agregację białek nie tylko zmniejszają liczbę komórek „przetrwałych” w danej populacji, ale również uwrażliwiają komórki w stanie „przetrwałym” na antybiotyki. Do potwierdzenia związku między indukowanym hamowaniem agregacji białek a zmniejszeniem powstawania komórek „przetrwałych” wybrano trehalozę, która była osmolitem najwydajniej zmniejszającym zdolność komórek do osiągnięcia stanu „przetrwałego” oraz dostępny był zmutowany szczep *E. coli* nieprodukujący endogennej trehalozy (*E. coli* Δ *otsA*). Doktorantka wykazała, że w hodowli *E. coli* Δ *otsA* liczba komórek „przetrwałych” była wyższa niż w szczepie dzikim, zarówno w warunkach optymalnych dla wzrostu jak i w warunkach stresu temperaturowego, czym potwierdziła swoiste, niekoniecznie bezpośrednie, działanie trehalozy na powstawanie komórek „przetrwałych” badanego szczepu *E. coli*. Dalsze badania Doktorantki wykazały, że działanie badanych związków na inne szczepy *E. coli* (dwa uropatogenne izolaty kliniczne) lub inny gatunek bakterii (*P. aeruginosa* PAO1-L) nie jest uniwersalne w kontekście powstawania komórek „przetrwałych”. Działanie trehalozy na dwa izolaty kliniczne było przeciwstawne (w hodowli jednego szczepu poziom komórek przetrwałych ulegał zwiększeniu, a w hodowli drugiego zmniejszeniu). Natomiast działanie związków na hodowle *P. aeruginosa* PAO1-L nie było identyczne jak działanie na hodowle *E. coli*; szczególną rozbieżność obserwowano w działaniu octanu sodu, którego dodatek do podłoża zwiększał agregację białek i liczbę komórek „przetrwałych” *E. coli*, natomiast zmniejszał liczbę komórek „przetrwałych” w hodowlach *P. aeruginosa*. Wyniki te świadczą o złożoności problematyki komórek „przetrwałych” i zależności ich powstawania również od kontekstu genetycznego (różnic międzyszczepowych i międzygatunkowych). Odrębnym zagadnieniem nad którym pracowała Doktorantka było opracowanie metody izolacji komórek „przetrwałych” z całej populacji komórek w hodowli. Doktorantka spodziewając się, że agregacja białek będzie nadawała komórkom unikatowe cechy, wybrała metodę ultrawierowania w gradiencie Percollu jako podejście

do rozdzielenia komórek przetrwałych od reszty komórek hodowli. Chociaż udało jej się uzyskać frakcje komórek o różnej gęstości pozornej w przypadku dwóch szczepów *E. coli* (dzikiego i Δ otsA), to dokładna analiza tych frakcji wykazała, że komórki „przetrwałe” dwóch szczepów różnią się gęstością pozorną i metoda obrona przez Doktorantkę nie może być uznana za uniwersalną służącą do izolacji frakcji komórek „przetrwałych”.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu. Nasunęły mi się jednak następujące spostrzeżenia i pytania:

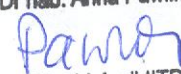
1. Doktorantka wykorzystała stosunkowo niewiele technik do przeprowadzenia badań i nie były one zaawansowane technologicznie; metody te pozwalały na badanie bakterii przetrwałych w obecności komórek całej populacji (przypomnę, że komórki przetrwałe stanowią zaledwie ~1% komórek w starzejącej się hodowli). Chociaż zastosowane metody umożliwiły dokonanie obserwacji zależności między działaniem związków stosowanych w pracy (MOPS, osmolity, octan sodu), agregacją białek i powstawaniem komórek „przetrwałych”, to nie pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów tych zależności, a tym bardziej zjawiska powstawania komórek „przetrwałych”. W wielu eksperymentach swoiste efekty w badanych zjawiskach były prawdopodobnie w znaczącej części maskowane przez populację komórek nie znajdujących się w stanie „przetrwałym” (np. obserwowano zwiększoną agregację Dps w ogólnej puli komórek, natomiast późniejsze badania nie wskazały na udział Dps w tworzeniu komórek „przetrwałych”). Zastosowanie takiego podejścia utrudniło jednoznaczną interpretację wyników i sprawiło, że ich dyskusja jest w wielu miejscach spekulacyjna.
2. W doświadczeniu dotyczącym badania wpływu trehalozy na wrażliwość bakterii na antybiotyk aminoglikozydowy kanamycynę (rozd. 6.6) Doktorantka wykazała, że trehaloza obniża częstość powstawania komórek „przetrwałych” opornych na kanamycynę i zwiększa wrażliwość komórek „przetrwałych” na kanamycynę. Efekt ten jest znoszony przez działanie związku rozpraszającego siłę protonomotoryczną PMF (siła PMF jest potrzebna do transportu antybiotyków aminoglikozydowych do wnętrza komórki bakteryjnej). Na tej podstawie Doktorantka wysnuła wniosek (str. 52), który następnie dyskutowała (str. 75), że prawdopodobnie trehaloza poprzez zmiany metaboliczne stymuluje siłę PMF badanych komórek i w ten sposób wpływa na ich wrażliwość na kanamycynę. Czy wniosek ten jest uprawniony w sytuacji gdy Doktorantka nie prowadziła badań dotyczących siły protonomotorycznej PMF ani w obecności ani przy braku trehalozy?
3. Nie jest napisane w pracy na jakiej podstawie Doktorantka podpisuje określone prążki białkowe nazwami białek (EF-Tu i Dps na Rys. 14A, str. 40). W jaki sposób zostały one zidentyfikowane? Domyślam się, że metodą spektrometrii mas (Materiały i Metody, rozdz. 5.6), ale nie wiadomo czy analizowano pojedyncze białkowe prążki, ile tych prążków zbadano, itp.
4. MOPS w przypadku szczepu *E. coli* MC4100 wykazywał największy efekt hamowania agregacji białek i tworzenia komórek „przetrwałych”. Dlaczego w badaniu tworzenia komórek

„przetrwałych” w hodowlach szczepów klinicznych *E. coli* oraz *P. aeruginosa* Doktorantka zrezygnowała ze stosowania MOPS?

5. Dlaczego w doświadczeniach i/lub w Dyskusji Doktorantka nie podjęła próby powiązania wpływu związków opiekuńczych na odpowiedź ścisłą indukowaną w komórkach bakteryjnych. Obecnie uważa się, że powstawanie komórek „przetrwałych” zależy głównie od zachwiania równowagi systemów toksyna-antytoksyna (TA) i indukowania odpowiedzi ścisłej. Systemy TA są dyskutowane w pracy oraz wykazano ich udział w tworzeniu komórek „przetrwałych” *P. aeruginosa*, natomiast odpowiedź ścisła opisana jest w pracy w bardzo szczątkowej formie. Czy istniały przesłanki wykluczające zależność obserwowanych zjawisk od odpowiedzi ścisłej?
6. Czy właściwie podano skład buforu TBS (rozdz. 5.4, str. 34), który zgodnie z informacją zawierał 0,5M NaCl na wszystkich etapach inkubacji z przeciwciałem?
7. Nie podano składu buforu do lizy (rozdz. 5.4, str. 35).
8. Uważam, że powinno się podawać numery katalogowe ważnych odczynników jak np. przeciwciał, ponieważ sam opis „kozie przeciwciała skierowane przeciwko króliczym IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma)” (rozdz. 5.4, str. 34) nie pozwala na jednoznaczną identyfikację ważnego materiału.
9. Praca zawiera nieliczne błędy literowe, językowe lub skróty myślowe, które nie utrudniały czytania rozprawy. Warto jednak zwrócić uwagę na precyzyjność pewnych określeń i sformułowań. Np. zamiast „z rodzaju *Mycobacteria* i *Corynebacteria*” (str. 27) powinno być „z rodzaju *Mycobacterium* i *Corynebacterium*”; w innym miejscu „brak lub niski poziom Dps uszkadzając DNA prowadzi do aktywacji odpowiedzi SOS, a następnie syntezy toksyny TisB (...)” (str. 72) jest skrótem myślowym, ponieważ nieobecność białka Dps nie uszkadza DNA, DNA jest uszkadzane przez inne czynniki w sytuacji braku lub obniżonego poziomu Dps.

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Leszczyńskiej mogę stwierdzić, że pomimo przedstawionych uwag, zawiera ważne wyniki naukowe. Świadczy o tym fakt opublikowania znaczącej części z nich w recenzowanych artykułach naukowych. Jeden, w którym Pani Leszczyńska jest wiodącym autorem (pierwsze autorstwo dzielone z Panią Matuszewską) ukazał się w czasopiśmie *PlosOne*; drugi, w którym Pani Leszczyńska jest jednym ze współautorów pracy, ukazał się w czasopiśmie *Microbiology*. Tematyka badawcza związana z komórkami „przetrwałymi”, z wpływaniem na ich tworzenie i uwrażliwianiem tych komórek na działanie antybiotyków jest wciąż aktualna i myślę, że wyniki badań Pani Leszczyńskiej będą wykorzystane w planowaniu następnych prac i w dyskusjach naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Darii Leszczyńskiej spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Darii Leszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii IITD PAN