



Prof. dr hab. Teresa Olczak
Tel. 71 3752 612
E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 4.11.2020 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Godlewskiej pt. „Antybakteryjna rola chemeryny i jej bioaktywnych pochodnych w nabłonkach jamy ustnej i skóry”

Rozprawa doktorska mgr Urszuli Godlewskiej została zrealizowana w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Cichy. Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się nie tylko w nurt badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. Joanny Cichy, ale także w najnowsze trendy badań nad mechanizmami odpowiedzi układu immunologicznego na obecność patogennych drobnoustrojów.

Rozprawa doktorska to zestaw 3 prac eksperymentalnych (opublikowanych w czasopiśmie Frontiers in Immunology, Frontiers in Microbiology, Journal of Biological Chemistry) i 2 prac przeglądowych (Current Microbiology, Postępy Biochemii) oraz ich omówienie w formie Autoreferatu. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, a także autorem do korespondencji w pracach przeglądowych. Na 32 stronach Autoreferatu mgr Urszula Godlewska przedstawiła wszystkie elementy wymagane do opisu tego typu prac, prezentujące zawartość rozprawy doktorskiej.

Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej ciekawym wstępem. Istotnym uzupełnieniem wstępu są 2 prace przeglądowe (Current Microbiology i Postępy Biochemii), prezentujące obecny stan wiedzy dotyczącej tematyki podjętej w rozprawie doktorskiej. W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki oraz ich potencjalne znaczenie, odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. W podsumowaniu Doktorantka krótko przedstawia swoje najważniejsze osiągnięcia. Na pozytywną uwagę zasługuje klarowność tego opisu, co nie jest proste w przypadku publikacji wieloautorskich. Piśmiennictwo obejmuje 44 pozycje literaturowe, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego. Praca zawiera także spis publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora, z opisem dominującego (45-85%) wkładu Doktorantki w poszczególne prace. W pracy doktorskiej znalazł się również szczegółowy opis udziału w doświadczeniach, przeprowadzonych przez współautorów publikacji. Zakres pracy

w poszczególnych publikacjach został także potwierdzony w oświadczeniach wszystkich współautorów.

Pod względem edytorskim oraz merytorycznym praca doktorska jest napisana bardzo dobrze, praktycznie bezbłędnie. Dużym atutem rozprawy jest bardzo klarowny sposób przedstawienia wszystkich wyników. W Autoreferacie Doktorantka krótko omawia uzyskane przez siebie wyniki, odnosząc się do rysunków i tabel zamieszczonych w publikacjach. Przy doświadczeniach wykonanych przez współautorów, jasno zaznacza zakres prac wykonanych przez innych, wykorzystując te wyniki do uzupełnienia wysuwanych wniosków oraz dyskusji. Bardzo pomocne w lekturze pracy doktorskiej, oprócz głównego rozdziału Podsumowanie, są krótkie wnioski zamieszczone na końcu każdego rozdziału.

Głównym celem pracy doktorskiej była charakterystyka wpływu chemeryny i uzyskanego z chemeryny peptydu p4 na bakterie mikrobiomu jamy ustnej i skóry, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu działania peptydu p4 oraz mechanizmu generowania oporności bakterii na peptyd p4. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent zalicza:

- 1) Porównawczą charakterystykę działania chemeryny i peptydu p4 na bakterie mikrobiomu jamy ustnej,
- 2) Porównawczą charakterystykę działania chemeryny i peptydu p4 na bakterie mikrobiomu skóry,
- 3) Wyjaśnienie mechanizmu działania peptydu p4, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu peptydu p4 na błonę komórkową, ścianę komórkową, strukturę nukleoidu bakteryjnego, ekspresję wybranych genów,
- 4) Opisanie czynnika odpowiedzialnego za nadawanie fenotypu oporności bakterii na peptyd p4.

Szczególnie interesujące wydaje się poznanie mechanizmu działania peptydu p4 (m.in. poprzez zastosowanie jego analogów), który angażuje nie tylko działanie na błonę i ścianę komórkową bakterii, typowe dla peptydów antybakteryjnych. Ciekawe było odkrycie wiązania się peptydu p4 do DNA i zbadanie jego wpływu na kondensację nukleoidu zależną od fazy wzrostu bakterii, czy też na ekspresję niektórych genów (m.in. *rpoS*). Wyniki uzyskane z tych ostatnich doświadczeń dały podstawę do wysunięcia hipotezy, że bakterie mogą wykształcać tolerancję wobec peptydu p4, m.in. poprzez utrzymywanie metabolizmu komórkowego typowego dla fazy stacjonarnej oraz modulację ekspresji czynnika transkrypcyjnego sigma S.

Co istotne, wiele doświadczeń wykonano badając liczne gatunki bakterii, tworzące dany mikrobiom.

W krótkim podsumowaniu tych osiągnięć można stwierdzić, że realizacja pracy doktorskiej pozwoliła Doktorantce na uzyskanie nowych wyników, które istotnie poszerzają aktualną wiedzę obejmującą antybakteryjne właściwości małych białek i peptydów. O ile pewne właściwości chemeryny były już znane, to dalsze badania nad tym małym, wielofunkcyjnym białkiem, a zwłaszcza badania nad peptydem p4 są całkowicie nowe, zarówno pod względem poznawczym, jak i pod względem potencjalnych możliwości zastosowania terapeutycznego w walce z patogenami głównych miejsc barierowych ludzkiego organizmu, czyli nabłonka jamy ustnej oraz skóry. Zróżnicowane działanie antybakteryjne peptydu p4, wykazane przez Doktorantkę m.in. w chorobach przyzębia oraz łuszczycy, potwierdza takie możliwości. Częściowo zostało to udowodnione poprzez badania zrealizowane przez innych współautorów publikacji, poprzez zastosowanie modelu komórkowego oraz zwierzęcego.

Na podstawie opisanych wyników oraz udziału Doktorantki w poszczególnych doświadczeniach Recenzent zakłada, że w ramach prowadzonych badań mgr Urszula Godlewska nabyła doświadczenie w różnorodnych metodach i technikach, w tym technikach biologii molekularnej, metodach biochemicznych, mikrobiologicznych, mikroskopowych. Gwarantuje to szeroki wachlarz umiejętności, które mogą być wykorzystane z powodzeniem w kontynuacji pracy badawczej. Na pozytywną uwagę zasługuje też samodzielność w opracowywaniu wyników, przygotowaniu materiału i pisaniu manuskryptów.

Pomimo wcześniejszego zrecenzowania prac przez recenzentów czasopism, przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników w Autoreferacie oraz bardzo dobrej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu poszerzenie dyskusji:

- 1) Wyniki przedstawione w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* potwierdzają większą wrażliwość bakterii *Porphyromonas gingivalis* szczepu ATCC 33277 w porównaniu ze szczepem W83 na działanie czynników antybakteryjnych, w tym na peptyd p4. Podobne działanie można przypisać izoformom chemeryny. W pracy nie ma jednak wyjaśnienia podłoża takich różnic.
- 2) Analiza oddziaływania peptydu p4 ze strukturami powierzchni komórki oraz wpływ peptydu p4 na kondensację chromosomu, przedstawione w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology*, zostały przeprowadzona z wykorzystaniem bakterii *Escherichia coli*, *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*. Czy różnice w budowie ściany komórkowej i błony komórkowej oraz w składzie genomów mogą

wyjaśniać zmniejszoną wrażliwość lub brak wrażliwości na peptyd p4 wirulentnych szczepów bakterii *P. gingivalis* ?

- 3) W pracy opublikowanej w Journal of Biological Chemistry bardzo szczegółowo przedstawiono wpływ warunków utleniająco-redukujących na aktywność biologiczną peptydu p4. Wykazano, że największą aktywność antybakteryjną (w tym wobec patogennego szczepu MRSA *S. aureus*) peptyd p4 wykazuje w warunkach utleniających poprzez zaangażowanie zależnych od takiego środowiska szlaków w komórkach bakteryjnych. Czy środowisko rozwoju bakterii (bakterie tlenowe żyjące w warunkach utleniających *versus* bakterie beztlenowe żyjące w warunkach redukujących) może determinować stan wrażliwości na peptyd p4 ?
- 4) Na str. 22 Autoreferatu Doktorantka pisze „... oczyszczone uprzednio za pomocą HPLC.....” oraz „...formy peptydu oczyści się z roztworu przy pomocy HPLC, ...” Czy te sformułowania są poprawne ? W opublikowanych pracach znajdują się nieco inne opisy.

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Urszuli Godlewskiej nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje, oprócz 5 publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, jeszcze współautorstwo w 2 opublikowanych pracach. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej i już opublikowane, jak również pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko. Nie można pominąć także faktu, że wyniki przedstawione w opublikowanych pracach zostały już pozytywnie ocenione przez recenzentów tych renomowanych czasopism.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Urszuli Godlewskiej pod względem naukowym całkowicie spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Dlatego też, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz opublikowanie wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej w renomowanych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Godlewskiej stosowną nagrodą.

