



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

Wrocław, 22.08.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Wielento pt. „A novel mechanism of manipulation of the host immune response by *Porphyromonas gingivalis*: The role of PPAD and fimbriae in TLR2-dependent signaling”

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Wielento została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii, na wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy oraz dr Aleksandra Grabca. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób przyzębia, często korelujących ze schorzeniami układowymi o podłożu zapalnym. Doktorantka w swojej pracy koncentruje się na jednym z kluczowych czynników etiologicznych tych chorób, czyli bakteriiach *Porphyromonas gingivalis*. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej przez Doktorantkę są kontynuacją badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. Jana Potempy i wnoszą nowe dane do tej dziedziny.

Rozprawa doktorska to zbiór prac obejmujący 2 opublikowane prace (Frontiers in Immunology, Molecular Oral Microbiology) oraz dane nieopublikowane, które z pewnością wejdą w skład trzeciej pracy. W ramach Autoreferatu (123 strony oraz stosowne oświadczenia współautorów opublikowanych prac), Doktorantka najpierw wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy obejmujący charakterystykę chorób przyzębia i opis głównych czynników wirulencji wykorzystywanych przez bakterie *P. gingivalis* w zapoczątkowaniu i rozwoju chorób przyzębia, a także w przebiegu towarzyszących chorób układowych. Doktorantka bardziej szczegółowo charakteryzuje deiminazę peptydyloargininową (PAD), ze szczególnym uwzględnieniem enzymu produkowanego przez bakterie *P. gingivalis* (PPAD), uznawanego za jeden z głównych czynników wirulencji tych bakterii, zwłaszcza w odniesieniu do chorób układowych o podłożu zapalnym. Część wstępu została poświęcona opisowi fimbrii oraz innych czynników wirulencji bakterii *P. gingivalis* (gingipainy, lipopolisacharyd, pęcherzyki błony zewnętrznej). Część wstępu to także opis receptora TLR2 i jego znaczenia w przebiegu chorób przyzębia.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej była dalsza charakterystyka PPAD. Szczegółowe cele obejmowały badania nad rolą cytrulinacji białek bakterii *P. gingivalis* w procesie przekazywania sygnału przy udziale receptora TLR2, identyfikacja cytrulinowanych białek

bakterii *P. gingivalis*, które wpływają na ten proces, ze szczególnym uwzględnieniem białek fimbrii oraz analiza odpowiedzi immunologicznej na cytrulinowane białka bakteryjne, głównie białka fimbrii. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane.

Do realizacji założonego celu pracy doktorskiej mgr Aleksandra Wielento wykorzystwała szeroki panel metod badawczych (m.in. techniki biologii molekularnej, analityczne i preparatywne metody biochemiczne, hodowle komórkowe). Część badań obejmowała także doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych pozyskanych z materiału pobranego od pacjentów. Bardzo pomocne, zwłaszcza dla osób mniej zorientowanych w tych technikach, jest bardziej szczegółowe przedstawienie we wstępie głównych metod doświadczalnych wykorzystanych w pracy doktorskiej, w tym tych z użyciem reporterowej linii komórkowej (U251 MG), ludzkich pierwotnych fibroblastów dziąsłowych (PHGF), makrofagów pozyskanych z ludzkich monocytów (hMDM).

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*. Istotny jest także fakt, że większość tych wyników została już opublikowana, czyli została poddana dogłębnej ocenie przez specjalistycznych recenzentów renomowanych czasopism. Na szczególną uwagę w rozprawie doktorskiej zasługuje wykazanie, że:

- 1) cytrulinacja białek fimbrii bakterii *P. gingivalis* zachodzi podczas formowania się fimbrii;
- 2) aktywacja TLR2 jest zależna od cytrulinacji i obecności fimbrii w badanych szczepach bakterii *P. gngivalis*;
- 3) ligandem dla TLR2, modyfikowanym przez cytrulinację, nie jest białko FimA, lecz białka akcesorowe fimbrii (FimCDE);
- 4) cytrulinacja białek fimbrii bakterii *P. gingivalis* prowadzi do prozapalnej aktywacji nie tylko reporterowej linii komórkowej, ale także do prozapalnej odpowiedzi makrofagów oraz do zwiększonej przeżywalności bakterii wewnątrz makrofagów.

W rozdziale Dyskusja ogólna, Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki, krytycznie je ocenia oraz wskazuje na ich potencjalne znaczenie, a także szeroko odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze. Wskazuje także na konieczność dalszych badań, podając konkretne przykłady niektórych proponowanych doświadczeń. Cytowania zawarte w 2 opublikowanych pracach zostały uzupełnione dodatkowymi 133 pozycjami literaturowymi, co świadczy o zdolności Doktorantki do poszukiwania i poszerzania wiedzy.

Pod względem merytorycznym i edytorskim praca doktorska jest napisana bardzo dobrze. W pracy pojawiają się bardzo nieliczne niedoskonałości, które nie wpływają na wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a Recenzent wskazuje je tylko z obowiązku (np. bardzo często stosowane w rozprawie określenie „Procaryota” zamiast „Prokaryota”; trochę niejasne stwierdzenie ze str. 21: „... and expressing a vector encoding...” – w tym zdaniu podkreślenia wymaga raczej tylko gen kodujący TLR2, będący częścią tego wektora; na str. 88 jest „...gradient at 300g...” – powinno być „...gradient at 300×g...”; na str. 95 jest „...strain for 30’...” – powinno być „...strain for 30 min...”; na str. 108 jest „Pg survival rate...” – powinno być „*P. gingivalis* survival rate...”). W przypadku pierwszej pracy, opublikowanej w momencie oddania rozprawy doktorskiej do recenzji, lepsze byłoby przedstawienie w rozprawie całej oryginalnej wersji pracy, a przynajmniej całej pierwszej strony.

Pomimo przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników, pozytywnej oceny większości z nich przez ekspertów oraz wyczerpującej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu wyjaśnienia pewnych kwestii i poszerzenia dyskusji zawartej w pracy doktorskiej:

- 1) W Autoreferacie, w opisie doświadczeń przedstawionych w opublikowanych pracach, a także w załączonych oświadczeniach („wykonanie oznaczeń”) brak jest wyjaśnienia, które dokładnie doświadczenia zostały przeprowadzone przez Doktorantkę i na których rysunkach lub w tabelach zostały zamieszczone uzyskane z nich wyniki. Recenzent zakłada, że dodatkowe, nieopublikowane wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych tylko przez Doktorantkę.
- 2) Dlaczego układ wyników na rysunku nr 6 w pierwszej opublikowanej pracy (Frontiers in Immunology) jest inny, aniżeli ten w rozprawie (str. 41) ?
- 3) Czy w przypadku pozyskiwania krwi ze Stacji Krwiodawstwa (str. 88) wymagana była Zgoda Komisji Etycznej ?
- 4) Ze względu na trudności techniczne identyfikacji cytrulinacji w fimbriach bakterii *P. gingivalis* w materiale uzyskanym od pacjentów, wskazane przez Doktorantkę w rozprawie, nie potwierdzono tego faktu do tej pory. Czy znane są już jakieś dane potwierdzające takie modyfikacje, a wspomniane przez Doktorantkę jako doświadczenia prowadzone we współpracy z innym zespołem ?
- 5) Na str. 34 Doktorantka podsumowuje część swoich wyników opublikowanych w pierwszej pracy stwierdzeniem „The lack of signaling by the W83 strain in U251 MG-hTLR2 cells is likely due to the absence of the protein(s) susceptible to modification by

PPAD.” W tytule rysunku nr 4 stwierdza „The ability of clinical strains to activate TLR2 is much weaker than that of ATCC 33277”. Wiele doniesień, w tym również prace z udziałem Doktorantki, potwierdza różnice w oddziaływaniu bakterii *P. gingivalis* z różnymi typami modelowych komórek, uzależnione także od rodzaju szczepu. Szczep ATCC 33277 jest uważany za mniej wirulentny, częściej spotykany u osób zdrowych, aniżeli u chorych z chorobami przyzębia. Z badań Doktorantki wynika, że ten szczep, w porównaniu z bardziej wirulentnym szczepem W83 lub klinicznymi izolatami, bardziej nasila niekorzystną odpowiedź prozapalną, co zostało także potwierdzone w drugiej opublikowanej pracy oraz w ramach wyników jeszcze nieopublikowanych. Czy istnieje możliwość, że u pacjentów z chorobami przyzębia i reumatoidalnym zapaleniem stawów dominuje szczep ATCC 33277 ?

- 6) Różnice w indukcji odpowiedzi zależnej od TLR2 mogą mieć związek z różnym genotypem fimbrii, o czym Doktorantka wspomina w dyskusji, koncentrując się na białkach Fim, których nie produkuje szczep W83. Czy różnice w białkach Mfa, występujące w obydwu szczepach, mogą też mieć znaczenie ? Czy są w nich potencjalne miejsca cytrulinacji ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Aleksandry Wielento nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 3 dodatkowe prace, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych (Scientific Reports, Acta Biochimica Polonica, Journal of Dental Research). Dlatego też, zarówno wyniki zawarte w opublikowanych pracach oraz nieopublikowane wyniki opisane w rozprawie doktorskiej, a także pozostały dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany ściśle z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Wielento pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Teresa Olcay