

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

26.09.2023r. Gdańsk

Dr hab. Joanna Nakonieczna, prof. UG
Tel: +48 58 5236327
Fax: +48 58 5236426
joanna.nakonieczna@biotech.ug.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Brzozy

„Patofizjologia naskórka w kontekście infekcji gronkowcowej i zmian atopowych”

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Piotra Brzozy została wykonana w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace badawcze przeprowadzono pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Cichy.

Szacuje się, że ok. 30% populacji światowej to nosiciele oportunistycznego patogenu – *Staphylococcus aureus*. Nosicielstwo dotyczy głównie nabłonka jamy nosowej, w mniejszym stopniu skóry. Natomiast w niektórych populacjach, np. u chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS) nosicielstwo *S. aureus* jest znacząco wyższe niż średnia populacyjna i w sposób istotny przyczynia się do zaostrzenia objawów chorobowych. Z drugiej strony gronkowce komensalne, np. *Staphylococcus epidermidis*, utrzymują, poprzez liczne interakcje międzygatunkowe, kondycję zdrowej skóry w homeostazie. Rola keratynocytów w oddziaływaniu bakterii ze skórą przez wiele lat była niedoceniana, natomiast, choćby ze względu na swoją liczną reprezentację w skórze, jak się obecnie okazuje, rola keratynocytów jest niezwykle istotna. Mechanizmy leżące u podstaw oddziaływania bakterii, w szczególności gronkowców, z komórkami skóry jak do tej pory nie zostały w dobrze poznane, a właściwie dopiero od kilku czy kilkunastu lat są zgłębiane, w tym przez zespół prof. Joanny Cichy.

Doktorant w swojej pracy doświadczalnej sformułował dwa nadrzędne cele: (i) analizę odpowiedzi keratynocytów na obecność *S. aureus* lub *S. epidermidis* oraz (ii) zbadanie roli kalikrein obecnych w naskórku w tworzeniu aktywnych form chemeryny.

Doktorant zastosował w swojej pracy bardzo ciekawy i nietłwy model hodowli 3D naskórka ludzkiego, w którym odtworzył cztery kluczowe warstwy komórek charakterystycznych dla normalnego naskórka ludzkiego. Zastosowanie wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania RNA, jako podstawowej i głównej metody realizacji celu pierwszego, pozwoliło Doktorantowi na zidentyfikowanie panelu genów, ulegających zmienionej ekspresji w keratynocytach, pod wpływem działania typowego gatunku komensalnego *S. epidermidis* i typowego patogenu *S. aureus* względem komórek nie poddanych traktowaniu bakteriami. Ponadto, analiza danych przeprowadzona przez Doktoranta pozwoliła na zróżnicowanie odpowiedzi keratynocytów na każdy z analizowanych gatunków i porównanie ich między sobą. Doktorant wykazał, że w przypadku odpowiedzi keratynocytów na obecność *S. epidermidis* aktywacji ulegają geny związane z odpowiedzią immunologiczną (interleukiny, cytokiny) oraz te, kodujące czynniki transkrypcyjne z nią związane (np., JUN), natomiast obniżonej ekspresji ulegają geny związane z procesami keratynizacji (np. lorykryna). Podobnie dla *S. aureus* Doktorant zauważył zmniejszenie ekspresji genów związanych z funkcjami barierowymi naskórka, jednakże wyraźnie widoczne są klastry funkcjonalne charakterystyczne tylko dla *S. aureus*, np. geny związane z metabolizmem lipidów, czy geny kodujące proteazy z grupy kalikrein i ich inhibitory. Szczególnie zmiany ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów uważam za bardzo interesującą obserwację. Doktorant prześledził, stosując metodę ilościowej reakcji rt-PCR, 3 grupy genów (w sumie 15 genów): (i) związane z metabolizmem lipidów, (ii) geny kodujące kalikreiny, (iii) geny związane z odpowiedzią immunologiczną, ulegające zmianie pod wpływem *S. aureus*. Stosując różne mutanty i szczepy *S. aureus*, Doktorant zasugerował istotną rolę tworzenia biofilmu w interakcji pomiędzy bakteriami a komórkami gospodarza. Efekt ten nie był obserwowany dla mutantu Aur, konstytutywnie produkującego metaloproteazę – aureolizynę, co skutkuje brakiem lub znacznym obniżeniem możliwości formowania biofilmu. W opisie wykorzystanych mutantów (Wyniki, str. 74) zabrakło opisu ich fenotypu związanego z produkcją biofilmu, co ułatwiłoby lepsze zrozumienie uzyskanych wyników, a przede wszystkim wniosku sformułowanego przez Doktoranta (str. 80), który brzmi: „krytycznym czynnikiem różnicującym odpowiedź keratynocytów jest zdolność *S. aureus* do tworzenia stabilnego biofilmu”.

Pytanie: Jaki był fenotyp wykorzystanych w analizie qPCR mutantów w aspekcie tworzenia biofilmu (str. 74)? Jaki był status tych elementów genetycznych (aur, agr, SarA, sspABC) w szczepie Newman i klinicznym izolacie od pacjenta z AZS – P04/06? Jakie jest zdanie Doktoranta na temat szczepowo-zależnej koncepcji regulacji transkryptomu keratynocytów przez *S. aureus*?

W kolejnym etapie pracy Doktorant zweryfikował uzyskane w modelu hodowli organotypowych wyniki zmiany ekspresji wybranego panelu 15 genów na bioptatach skórnych pochodzących od zdrowych dawców, chorych na AZS lub chorych na łuszczycę. W tym wypadku Doktorant nie zaobserwował zmian w ekspresji genów kodujących kalikreiny i/lub ich inhibitory, czy też wybranych elementów układu odpornościowego, natomiast zmiany w ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów zostały potwierdzone również w tym bardziej złożonym modelu *ex vivo*. Badania przeprowadzone na bioptatach skórnych uważam za bardzo potrzebne i ciekawe, pomimo, że w tej konkretnej analizie nie były one w pełni zgodne z wynikami uzyskanymi na bardziej homogenym modelu hodowli 3D ludzkiego naskórka. Pokazuje to, jak bardzo złożony jest mechanizm leżący u podstaw oddziaływania bakterii z komórkami skóry.

Pytanie: Proszę Doktoranta o komentarz dotyczący zaobserwowanych różnic w analizie 3D i bioptatach ludzkich.

Ostatni etap analizy przeprowadzonej przez Doktoranta dotyczył badania aktywacji chemeryny przez proteazy naskórkowe z rodziny kalikrein, których zmniejszoną ekspresję wykryto w analizach RNA-seq, czyli pierwszej części doświadczeń składających się na recenzowaną rozprawę. Spośród analizowanej grupy pięciu kalikrein, Doktorant zidentyfikował KLK14 jako enzym, który jako jedyny generuje aktywne formy chemeryny w stężeniach fizjologicznych. Stosując analizy biochemiczne, metody chemii analitycznej oraz techniki bioinformatyczne, Doktorant scharakteryzował zależną od stężenia i czasu aktywność KLK14 względem chemeryny, zidentyfikował powstające formy aktywne oraz zaproponował wygenerowany *in silico* (AlphaFold) model prochemeryny. Wykazał również, że nowo zidentyfikowane i scharakteryzowane przez niego formy chemeryny jako substraty KLK14: Chem156F i Chem158K wykazują aktywność porównywalną z opisaną w literaturze kanoniczną formą chemeryny – Chem 157S. Co więcej, doktorant wskazał na istotność struktury III-rzędowej chemeryny w jej aktywności. Za bardzo cenny i ciekawy naukowo uważam wynik dotyczący możliwości regulacji aktywności chemeryny przez zmienne warunki oksydoredukcyjne. Mostki disiarczkowe obecne w strukturze chemeryny okazały się krytyczne dla jej aktywności. Zweryfikowanie biologicznego znaczenia uzyskanych *in vitro* wyników byłoby niezwykle cennym odkryciem naukowym. W wyniku analizy struktury I-rzędowej chemeryny Chem157S Autor zidentyfikował potencjalne dodatkowe miejsce proteolizy: R125-E126, które na podstawie spektrometrycznej analizy uzyskanego zmutowanego wariantu chemeryny L124A-R125A oraz jego aktywności w teście chemotaksji, zostało przez Doktoranta

wykluczone jako istotne dla aktywności badanego białka. Doktorant zweryfikował brak istotności wspomnianego miejsca proteolizy również w oparciu o dwie izoformy Chem156F i Chem158K.

Recenzowana praca ma postać monografii, przygotowana została w języku polskim i ma typową dla tego rodzaju opracowań strukturę, składającą się z: wstępu, celu pracy, materiałów, metod, wyników i dyskusji. Całość uzupełniona jest bogatym, dobrze dobranym spisem literaturowym, zawierającym 231 pozycji, z czego około 30% to najnowsza literatura przedmiotu. Zamysł przedstawienia pracy jest bardzo dobry, opiera się na zasadzie „od ogółu do szczegółu”, co daje wrażenie spójnej logicznej całości. W zwięzłym i konkretnym wstępie Doktorant daje odpowiednią ilość informacji do zrozumienia dalszych części pracy. Rozdziały Materiały i Metody są wystarczające, aby analizować doświadczenia.

Jakkolwiek uzyskane przez Doktoranta wyniki uważam za bardzo ciekawe, to sposób ich opisu pozostawia lekki niedosyt. W przypadku opisywania wyników bardzo dobrą praktyką byłoby rozpoczynanie każdego podrozdziału od krótkiego wstępu, który nakreśla cel danego eksperymentu, następnie przedstawienie wyniku i podanie konkluzji. Dla przykładu w rozdziale 5.1 *Aktywacja prochemeryny przez różne enzymy z rodziny KLK*. brakuje wstępu, choćby 1-2 zdań wprowadzających i przedstawienia celu opisywanego eksperymentu, dotyczy to wyników przedstawionych na Ryc. 30 i Ryc. 31. Ponadto, opisy rycin nie są pełne, tj. Autor pisze: „zaprezentowano średnią \pm SD”, ale nie wiadomo, jaka to średnia. Na tej samej rycinie Autor podaje opis: „time”, powinno być „czas”. W opisie doświadczeń w rozdziale Wyniki brakuje odsyłaczy do metod, co utrudnia weryfikację uzyskanych wyników. Na Ryc. 32 nie zaznaczono N- i C-końca. Nie jest poprawne określenie „okres czasu” (Ryc. 33), zamiast „wytestowano” może lepiej użyć przetestowano, zbadano. Brakuje wyjaśnienia w opisie Ryc. 35, czym jest „*” (gwiazdka) przy frakcji ‘prot 1’. Na Ryc. 40 brakuje wyjaśnienia legendy oraz parametru pisującego oś X, czyli $\log(C)$. W rozdziale Metody (str. 46) ilość enzymów dodanych do reakcji podaje się w liczbach jednostek. Brak wyjaśnienia parametru SCORAD (str. 39). W rozdziale dyskusja Doktorant systematycznie omawia i interpretuje uzyskane wyniki, w sposób uporządkowany odnosząc je do danych już opublikowanych. Rozdział ten jest opisany bardzo dobrze, co rekompensuje drobne edytorskie niedociągnięcia i przede wszystkim potwierdza wiedzę Doktoranta oraz wskazuje na umiejętność prowadzenia badań naukowych.

Na pochwałę zasługuje u Doktoranta podkreślenie wagi pracy zespołowej. W wielu miejscach Doktorant wyraźnie zaznacza, że doświadczenia były wykonywane nie tylko przez Niego, ale innych członków zespołu, np. oczyszczanie wariantów chemeryny lub wykonywano je we współpracy, np. analizy HPLC i MS. Doktorant wskazuje z imienia i nazwiska osoby, które jak rozumiem, wymiennie

z Autorem, izolowały epidermę z bioptatów, izolowały pierwotne keratynocyty czy przeprowadzały hodowle organotypowe. Warto również podkreślić, że Doktorant jest współautorem 3 opublikowanych prac przeglądowych, ściśle związanych z tematem prezentowanej rozprawy. Kolejne dwie prace z pierwszym autorstwem są bądź w recenzji bądź na etapie przygotowania manuskryptu.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Piotra Brzozy oceniam **pozytywnie**. Jest to praca stanowiąca oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, praca prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ponadto stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr65, z późn. zm.).

Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Piotra Brzozy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Dr hab. Joanna Nakonieczna, prof. UG