



Prof. dr hab. Teresa Olczak

Wrocław, 18.03.2024 r.

Tel. 71 3752 612

E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Gąsiorek pt. „MCPIP-1 w keratynocytach  
 dziąsłowych jako regulator procesu zapalenia przyzębia i ubytku kości”**

Rozprawa doktorska mgr Anny Gąsiorek została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii, na wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem dr hab. Joanny Kozieł, prof. UJ. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób przyzębia. 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 dr hab. Joanny Kozieł i wnoszą nowe dane do tej dziedziny.

Rozprawa doktorska to 186 stron drukowanego tekstu wraz z rysunkami i tabelami. Zawiera ona wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów i symboli oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo szczegółowe wprowadzenie do tematyki pracy badawczej. Szczególnie interesujące i pomocne w zrozumieniu oddziaływania bakterii *P. gingivalis* z tkanką przyzębia jest m.in. opis struktury i funkcji poszczególnych elementów budujących dziąsła oraz udział komórek odpornościowych w fizjologii dziąsła. Kolejne rozdziały, Materiały i metody oraz Wyniki, pomimo zaprezentowania w nich ogromnej liczby metod i uzyskanych wyników, przedstawione są w sposób umożliwiający właściwą ocenę pracy doktorskiej. Pomocny w tym jest także podział rozdziału Wyniki na 3 części i odniesienie danych z części I i II do pracy opublikowanej w czasopiśmie mBio. Rozprawę kończy bardzo obszerna Dyskusja oraz końcowe wnioski. Piśmiennictwo obejmuje 400 pozycji literaturowych, świadczących o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego. Praca zawiera także wykaz osiągnięć Doktorantki w formie publikacji oraz wystąpień konferencyjnych, a także udział Doktorantki w projektach badawczych.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej była charakterystyka udziału białka indukowanego chemotaktycznym białkiem monocytów-1 (białka MCPIP-1) w keratynocytach dziąsłowych w przebiegu infekcji periodontopatogenami. Szczególną uwagę poświęcono bakteriom *Porphyromonas gingivalis* oraz głównym czynnikiem ich wirulencji, czyli gingipainom. Szczegółowe cele pracy obejmowały wykazanie:

1. czy gingipainy biorą udział w potranslacyjnej modyfikacji białka MCPIP-1 i czy ma to wpływ na funkcjonowanie keratynocytów dziąsłowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich wrażliwości na endotoksyny bakteryjne,
2. czy wysoki poziom MCPIP-1 w nabłonku dziąseł bierze udział w utrzymaniu homeostazy w obrębie nabłonka dziąseł oraz ozębnej i kości wyrostka zębodołowego.

Zdaniem Recenzenta, założony cel pracy doktorskiej został w pełni osiągnięty. Do realizacji założonego celu pracy mgr Anna Gąsiorek wykorzystwała szeroki panel metod badawczych (m.in. techniki biologii molekularnej, analityczne i preparatywne metody biochemiczne, metody histologiczne, metody mikroskopowe, hodowle bakteryjne i komórkowe, modele zwierzęce). Taka różnorodność zastosowanych metod i technik wskazuje nie tylko na szeroki zakres umiejętności Doktorantki, ale także na zdolność do (samodzielnego lub we współpracy z promotorem) ich odpowiedniego doboru w zależności od badanego problemu.

Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw mechanizmów skutkujących chorobami przyzębia. Istotny jest także fakt, że część tych wyników została już opublikowana, czyli została poddana dogłębnej ocenie przez specjalistycznych recenzentów renomowanego czasopisma. Na szczególną uwagę w rozprawie doktorskiej zasługuje zdaniem Recenzenta nie tylko wskazanie białka MCPIP-1 jako jednego z czynników biorących udział w regulacji procesu zapalnego przyzębia i ubytku kości, jak to sugeruje Doktorantka w tytule pracy, ale przede wszystkim logiczny ciąg etapów tego mechanizmu. Do najciekawszych, zdaniem Recenzenta obserwacji należy nie tylko wykazanie wewnątrzkomórkowej degradacji białka MCPIP-1 przez różne proteazy bakteryjne (co zostało także wykazane wcześniej przez innych), ale fakt, że gingipaina RgpA, niezależnie od zastosowanego czynnika stymulującego receptor TLR-4, prowadzi do uwrażliwienia tego receptora i wzmocnienia sygnału przekazywanego z receptora, co w efekcie końcowym nasila proces zapalny (m.in. przez zwiększony poziom transkryptów kodujących cytokiny prozapalne)

i destrukcję tkanek utrzymujących zęby. Interesujące jest także wykazanie odwrotnego efektu działania gingipainy RgpA na makrofagi. Bardzo ciekawe jest również wykazanie udziału białka MCPIP-1 w wybiórczym niszczeniu tkanki kostnej przyzębia, zachodzącym przy udziale czynników produkowanych przez neutrofile (głównie chemoatraktanty i cytokiny prozapalne), wpływającego na funkcjonowanie osteoblastów. Poszczególne etapy proponowanego mechanizmu zostały bardzo dobrze przedstawione przez Doktorantkę we wnioskach końcowych.

Bardzo obszerna Dyskusja, z jednej strony stanowi ogromny zbiór danych literaturowych, co umożliwia zapoznanie się z podstawami wielu aspektów poruszanych w tej rozprawie. Z drugiej strony bardzo szczegółowy opis danych literaturowych często dominuje i utrudnia odnalezienie wyników, nad którymi dyskutuje Doktorantka (np. paragraf na str. 146 opisujący udział limfocytów w zapaleniu tkanki przyzębia jest oparty prawie w całości na danych literaturowych i zakończony jednozdaniowym, ogólnym podsumowaniem własnych wyników o nacieku neutrofile i późniejszym pojawianiu się limfocytów, które mogą promować uszkodzenie tkanki u myszy pozbawionych ekspresji genu *MCPIP-1*).

Pod względem merytorycznym i edytorskim praca doktorska jest napisana bardzo dobrze. Także rysunki i tabele są przedstawione i opisane poprawnie. W pracy pojawiają się nieliczne niedoskonałości, które nie wpływają na poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a część z nich Recenzent wskazuje tylko z obowiązku (np. str. 53 - „pipeta Paustera” zamiast „pipeta Pasteura”; str. 54 i inne strony - sformułowanie „inkubacje w 4°C” zamiast „inkubacje w temperaturze 4°C”; bardzo różny opis analizy ekspresji genów: str. 98 – poziom ekspresji genów sprawdza się wykorzystując metodę RT-PCR, str. 113 – „wyzolowano RNA i wykonano PCR w czasie rzeczywistym”, a na str. 115 – „oznaczono poziom ekspresji z wykorzystaniem techniki qPCR”; bardziej poprawne wydaje się użycie pełnej formy RT-qPCR, z ang. reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction).

Pomimo przejrzystego przedstawienia zastosowanych metod, bardzo dobrej prezentacji ogromnej ilości wyników, i może nieco mniej czytelnej Dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu wyjaśnienia pewnych kwestii:

1. W całej pracy Doktorantka stosuje często bardzo różną formę zapisu nazw genów, mRNA i białek eukariotycznych. Dotyczy to również stosowania różnych, często zamiennych wersji

zapisu nazw genu, mRNA, białka i szczepu myszy w przypadku białka MCPIP-1. Jaka jest właściwa pisownia ?

2. Dlaczego oprócz bakterii *Streptococcus oralis* i *S. salivarium* nie wykorzystano bakterii *S. gordonii* ? Ten ostatni gatunek jest bardzo powszechny w jamie ustnej i oddziałuje nieco inaczej z bakteriami *P. gingivalis*, aniżeli dwa pierwsze.
3. Jak wykazała Doktorantka, białko MCPIP-1 jest degradowane przez proteazy produkowane nie tylko przez bakterie *P. gingivalis*, ale także *P. intermedia* i *T. forsythia*, czyli główne periodontopatogeny. Ciekawe wydaje się wykazanie różnicy pomiędzy największą wydajnością proteolizy białka MCPIP-1 przez gingipainę RgpA w porównaniu z gingipainami RgpB i Kgp, przynajmniej w części wynikającą z dostępności reszt argininy i lizyny. Nie tłumaczy to jednak różnicy między gingipainą RgpA i RgpB. Jaka może być tego przyczyna ? Czy inne gingipainy też mogą powodować, może z mniejszą efektywnością, uwrażliwienie receptora TLR-4 keratynocytów na LPS – czy było to sprawdzane w komórkach keratynocytów dziąsłowych ? Jeśli nie, to co może być przyczyną tak wybiórczego efektu – czy tylko różnice w poziomie aktywności enzymatycznej ?
4. Nasilenie procesu zapalnego spowodowanego degradacją białka MCPIP-1 przez gingipainę RgpA zbadano m.in. poprzez pomiar ekspresji genów wybranych cytokin na poziomie transkryptu. Również globalna analiza ekspresji genów w tkance kostnej dziąseł myszy została przeprowadzona na poziomie mRNA. Jak może wyglądać poziom cytokin prozapalnych lub innych badanych białek na poziomie białka w odniesieniu do ich potencjalnej degradacji przez gingipainy ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Anny Gąsiorek nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje współautorstwo w 3 publikacjach, z czego jedna praca (opublikowana w czasopiśmie mBio), w której Doktorantka jest pierwszym autorem, zawiera część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej, a druga praca (opublikowana w Journal of Oral Microbiology), której drugim współautorem jest Doktorantka, zawiera opracowanie stosowanego w pracy doktorskiej modelu badawczego. Dodatkowo, planowane jest opublikowanie pozostałych wyników w 3 kolejnych manuskryptach. Dlatego też, zarówno wyniki zawarte w opublikowanej pracy oraz nieopublikowane wyniki opisane w rozprawie doktorskiej, a także pozostały dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany ściśle z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Gąsiorek pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom

doktorskim, a nawet je przewyższa. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 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.

Ze względu na szeroki zakres prowadzonych badań, znacznie przekraczający zawartość typowych rozpraw doktorskich, a także uzyskanie i częściowe opublikowanie w renomowanym czasopiśmie nowych, interesujących wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Gąsiorek.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Teresa Olach".