



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Miecznikowa 1, 02-945 Warszawa



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 10. 08. 2013.

Zakład Mikrobiologii Stosowanej UW

Ocena pracy doktorskiej mgr Klaudii Polakowskiej „Badania genetycznych i fenotypowych determinant specyficznej wobec gospodarza wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* z wykorzystaniem modeli *in vivo*.”

Rozprawa doktorska Pani mgr Klaudii Polakowskiej została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UW pod kierunkiem Pana dr. hab. Jacka Międzobrodzkiego, prof. UW oraz promotora pomocniczego, Pana dr. Benedykta Władękę. W Zakładzie Mikrobiologii UW pod kierunkiem Pana Profesora od lat prowadzone są badania nad molekularnymi podstawami patogenezы i patomechanizmem zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Zespół badawczy pod kierunkiem prof. Międzobrodzkiego zajmuje się przede wszystkim zagadnieniami dotyczącymi kolonizowania wyższych zwierząt przez bakterie, głównie różne gatunki gronkowców, a także mechanizmami transmisji bakterii pomiędzy różnymi gospodarzami. Zespół izoluje i identyfikuje bakterie pochodzące od zwierząt domowych, hodowlanych i dzikich, w tym od zwierząt zdrowych i chorych, ocenia ich cechy fenotypowe – enzymy i toksyny oraz cechy genetyczne (charakterystyka profilu chromosomowego DNA i określenie specyficznych genów). Poddana ocenie rozprawa doktorska jest więc ściśle związana z badaniami realizowanymi w Zespole badawczym i dotyczy mechanizmów molekularnych procesów patogenezы wywoływanych przez szczepy gronkowca złocistego. Rozprawa doktorska Pani mgr Polakowskiej stanowi obszerne studium dotyczące praktycznie molekularnej charakterystyki czynników patogenezы. Najważniejszym jednak celem badawczym rozprawy doktorskiej była ocena wirulencji bakterii *in vivo* przy użyciu zarodka kurzego jako nowego modelu badawczego, a po pomyślnym sprawdzeniu, wykorzystanie zarodka kurzego do oceny wirulencji gronkowca wydzielającego

stafopainę C i ocena udziału tego czynnika w patogenezie wywoływanej przez szczepy gronkowca. Doktorantka jednoznacznie wykazała, że zastosowanie w badaniach patogenezy modelu zarodka kurzego *G. gallus* pozwoliło na podział analizowanych szczepów pochodzenia drobiowego na grupy wirulentne, niewirulentne i o pośrednim poziomie zjadliwości, co w porównaniu z wynikami osiągniętymi przy zastosowaniu jako uniwersalnego modelu badawczego nicienia *C. elegans* pozwoliło na uprawniony wniosek doktorantki, iż odpowiedni wybór modelu doświadczalnego może znacząco wpływać na wyniki doświadczenia. W przypadku tej rozprawy wybór nowego modelu badawczego pozwolił na ocenę znaczenia specyficznego działania stafopainy C względem tkanek zarodka kurzego.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, t.j. w skład jej wchodzi kolejno: streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja i spis cytowanej literatury. Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona obszernym wstępem, który został opracowany na podstawie bogatego piśmiennictwa. Bardzo obszerne w pracy są też części: metodyczna oraz wynikowa, co wynika między innymi z faktu, iż dla rozwiązania problemów z konieczności zastosowano szereg wypróbowanych i znanych metod z zakresu biologii molekularnej. Dane eksperymentalne udokumentowane są za pomocą 20 rycin i 15 tabel. Otrzymane wyniki wnikliwie omówiono w dyskusji. Spis literatury jest także obszerny, obejmuje 262 pozycje. Oceniana rozprawa doktorska nie zawiera błędów merytorycznych. Jej ocena wydaje się nie być sprawą trudną, skoro część wcześniej uzyskanych przez doktorantkę wyników weszła w skład prac oryginalnych opublikowanych wcześniej w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, takich jak *Microbes and Infection* i *FEMS Immunology and Infection*. Doktorantka w rozprawie cytuje też kilka prac Zespołu, w których brała czynny udział i jest także współautorem. Można więc z całą pewnością uznać, że wykorzystanie zarodka kurzego do oceny determinantów patogenezy gronkowca złocistego było założeniem pomysłowym i pozwoliło na wykazanie znaczenia dotychczas niezdefiniowanych czynników patogenezy. Użycie modelu kurzego w porównaniu do modelu jakim dotychczas były nicienie pozwoliło na opisanie istotnych cech determinantów patogenezy specyficznych dla kręgowców. Z uzyskanych wyników Doktorantka wyciąga dość ciekawe wnioski. Okazało się, że do wydajnego stopnia kolonizacji i wirulencji bakterii w zarodku kurzym przyczynia się proces koewolucji w układzie bakteria-żywiciel. Doktorantka dyskutuje fakt, iż wydajność infekcji szczepów wyselekcjonowanych jako pasożyty kur może mieć

związek z posiadaniem specyficznych czynników patogenezy. Dlatego też szczepy izolowane od ludzi wykazują niższą aktywność w zarodkach kurzych, mogą też w innym stopniu zakażać komórki nicieni. Zabrakło mi w tych eksperymentach genomycznego podejścia do procesu zakażenia tkanek i analizy oraz wyjaśnienia, które z genów bakteryjnych są zaangażowane w procesy inwazji na konkretnych modelach zwierzęcych. Nie ma też odpowiedzi na pytanie, czy szczepy izolowane od różnych gospodarzy posiadają inny skład genowy, albo czy zjawisko to przy ewentualnie stabilnym zestawie genetycznym jest uzależnione być może od procesów regulacji genetycznej. U wielu patogenów w różnych etapach życia i w różnych warunkach uwalniane są skomplikowane procesy regulacyjne, pozwalające na ekspresję niezbędnych determinantów patogenezy. Na tak postawione pytanie chciałbym usłyszeć opinię doktorantki podczas obrony rozprawy doktorskiej. Jest oczywiste, że można mnożyć takie pytania, a przecież pojemność rozprawy doktorskiej ze zrozumiałych względów jest mocno ograniczona. Należy więc uznać, że praca doktorska Pani Klaudii Polakowskiej stanowi kompleksowe podejście badawcze wobec skomplikowanego układu bakteryjnych czynników patogenezy. Porównanie różnych modeli badawczych do porównania wirulencji szczepów gronkowca pozwoliło na uzyskanie nowych informacji o czynnikach patogenezy *Staphylococcus* w aspekcie ewolucyjnym. Wprawdzie niektóre wnioski są przedwczesne i muszą być potwierdzone kolejnymi eksperymentami z czego Doktorantka doskonale zdaje sobie sprawę, czemu wyraz dała w dobrze przeprowadzonej dyskusji wyników. Należy mocno podkreślić, iż uzyskanie pozytywnych wyników w przedstawionej rozprawie doktorskiej było możliwe dzięki prostemu, ale bardzo skutecznemu jak się okazało pomysłowi. Niezwykle atrakcyjna pod względem poznawczym jest obserwacja, że istnieją specyficzne dla procesu infekcji gronkowcowej proteazy, takie jak stafopaina, których specyficzne działanie w patogenezie dotychczas nie było podkreślane. Aczkolwiek pełna dokumentacja w tym zakresie wymagałaby uzyskania mutacji i potwierdzenia uzyskanych wyników poprzez spełnienie molekularne postulatów Kocha.

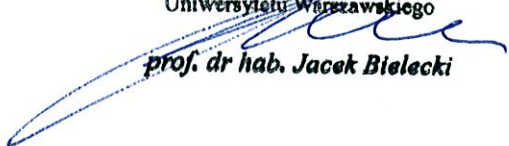
Zaprojektowanie eksperymentów i uzyskanie w wyniku ich realizacji tak wielu wartościowych wyników na pewno świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki. Wykonanie większości eksperymentów wymagało stworzenia wielu układów badawczych oraz dobrego przygotowania w zakresie biochemii białek.

Część eksperymentalna rozprawy pozwoliła na weryfikację wcześniej zakładanych hipotez badawczych. Do największych osiągnięć pracy, o dużym znaczeniu

aplikacyjnym w zakresie testowania patogennych szczepów gronkowca należy zaliczyć udaną próbę zastosowania zarodka kurzego do badań nad patogennością *Staphylococcus*. Wykrycie metody, która pozwala na zróżnicowanie groźnych szczepów patogennych otwiera nowe możliwości badawcze i wyznacza nowe kierunki badań. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest więc świetnie przeprowadzona dyskusja wyników, podczas której autorka na podstawie uzyskanych wyników sugeruje dobrze podparte pozycjami literatury wnioski prowadzące do wyjaśnienia nowych danych dotyczących patogenności gronkowców. regulacji syntezy RNA i związanego z tym procesem stanu fizjologicznego komórki bakteryjnej. Czytanie pracy, mimo wysokiego poziomu trudności ze względu na specjalistyczne zagadnienia i dużą zawartość informacji, a także często stosowane skróty, staje się przyjemnością szczególnie wtedy, gdy przedstawiane są bardzo prawdopodobne propozycje możliwości zastosowania modelu kurzego w badaniach dotyczących wirulencji gronkowców. Umiejętny opis wielu skomplikowanych procedur, a także proste i logiczne wyjaśnienia, oczywiście w miarę możliwości stosowanych skrótów i procedur, także przyczyniają się do pozytywnej oceny przedstawionej pracy doktorskiej.

Biorąc powyższe pod uwagę, uważam że rozprawa doktorska Pani mgr Klaudii Polakowskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego


prof. dr hab. Jacek Bielecki