

# INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC

Zakład Mikrobiologii  
Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy

Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć  
01-138 Warszawa ul. Płocka 26

Tel./ fax. + 22 4312182, e- mail: [e.kopec@igichp.edu.pl](mailto:e.kopec@igichp.edu.pl)



---

Warszawa, 21.12.2017 r.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć.

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

Zakład Mikrobiologii

## Recenzja

pracy doktorskiej magister Eweliny Błaszczyk pod tytułem „ Poli(A) polimeraza PAPI jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych leków przeciwgruźliczych”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy bardzo istotnego problemu zdrowia publicznego i epidemiologicznego jakim jest wzrost zachorowań na całym świecie na gruźlicę lekooporną i brak nowych skutecznych leków do leczenia.

Gruźlica (TB) jest chorobą zakaźną, która nadal pozostaje istotnym problemem zdrowotny w skali globalnej. W wielu chorobach zakaźnych możliwe jest zmniejszenie liczby zachorowań przez stosowanie zapobiegających zakażeniu szczepień ochronnych oraz leczenie chorych, którzy są potencjalnym źródłem zakażenia dla innych. Szczepienie przeciwko gruźlicy (BCG) nie chroni przed zakażeniem, zmniejsza jedynie ciężkość przebiegu choroby u dzieci. Dlatego jedynym obecnie skutecznym środkiem zwalczania gruźlicy jest jej wczesne wykrywanie i skuteczne leczenie

Według danych opublikowanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), w 2016 roku na świecie zarejestrowano 10,4 mln chorych na gruźlicę w tym 56% przypadków stanowili chorzy z Indii, Indonezji, Chin, Filipin oraz Pakistanu. W 2016 roku z powodu TB zmarło około 1,8 mln chorych, wśród których chorzy zakażeni wirusem HIV stanowili 390 000.

W Polsce sytuacja epidemiologiczna gruźlicy od lat ulega poprawie, a współczynnik zapadalności systematycznie spada. Według danych z Krajowego Rejestru Zachorowań na Gruźlicę, w Polsce w 2016 roku odnotowano 6444 zachorowań na TB, co stanowiło 0,06% w skali globalnej. Pomimo znacznej poprawy sytuacji epidemiologicznej, w Polsce wskaźniki te są nadal nieco wyższe niż w innych w krajach Europy Zachodniej (Niemcy: zapadalność 5,8/100.000 umieralność 0,32/100.000, Francja zapadalność 8,8/100.000, umieralność 0,56/100.000, Szwecja zapadalność 7,2/100.000, umieralność 0,14/100.000).

Gruźlica jest chorobą wyleczalną i można zapobiegać jej rozprzestrzenianiu się stosując odpowiednie metody diagnostyczne oraz właściwą antybiotykoterapię. Jednak największym zagrożeniem w realizacji programów zwalczania gruźlicy jest zjawisko wielolekooporności prątków. Szczególne znaczenie ma tu oporność typu MDR (ang. *multidrug resistant*) definiowana jest jako oporność na co najmniej izoniazyd i ryfampicynę, czyli dwa najskuteczniejsze leki przeciwprątkowe. Coraz częściej szczepy MDR nabywają oporności na dodatkowe leki przeciwprątkowe i osiągają postać *pre-XDR* (ang. *pre-extensively drug resistant*) oraz XDR (ang. *extensively drug resistant*). Oporność typu *pre-XDR* określana jest jako oporność MDR w połączeniu z opornością na fluorochinolony lub co najmniej jeden z leków podawanych parenteralnie, natomiast XDR jako oporność MDR z jednoczesną opornością na fluorochinolony i przynajmniej jeden z leków podawanych iniekcyjnie (amikacyna lub kapreomycyna, lub kanamycyna).

Obecnie na całym świecie, obserwuje się wyraźny wzrost częstości występowania i udziału chorych z gruźlicą MDR. W 2016 roku zarejestrowano 580 000 przypadków gruźlicy wywołanej prątkami opornymi na co najmniej izoniazyd i ryfampicynę czyli o 100 000 więcej niż w roku 2015. Według raportu WHO chorzy z gruźlicą XDR stanowili 9,7% wszystkich chorych z lekoopornością prątków MDR-TB. W Polsce w ciągu ostatnich lat również obserwuje się wzrost liczby zachorowań na gruźlicę MDR TB. W 2016 roku, w Krajowym Rejestrze Zachorowań na Gruźlicę zarejestrowano 52 chorych z gruźlicą MDR czyli o 12% (46 chorych) więcej niż w roku 2015 i o 67% (21 chorych) więcej niż w roku 2014.

Gruźlica lekowrażliwa jest chorobą wyleczalną w standardowym czasie sześciu miesięcy. Natomiast leczenie gruźlicy wielolekoopornej wymaga bardzo często dwóch i więcej lat, a wyleczenie uzyskuje się zaledwie u 52% chorych nowo wykrytych i 29% u chorych wcześniej

leczonych. Poza niepowodzeniami leczenia wskaźnik śmiertelności jest również wysoki. Leczenie gruźlicy wywołanej prątkami MDR i XDR jest około 100 razy droższe i dużo bardziej toksyczne dla chorych niż leczenie gruźlicy lekowrażliwej. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej wymaga stosowania wielu leków dodatkowych bardziej toksycznych, o słabszej aktywności przeciwprątkowej i w dłuższym czasie. Wzrastająca na świecie liczba chorych z gruźlicą wielolekooporną spowodowała konieczność poszukiwania nowych leków przeciwprątkowych, które umożliwiłyby jej skuteczne leczenie.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy bardzo istotnego problemu jakim jest poszukiwanie nowych miejsc docelowych dla leków przeciwprątkowych. Pani mgr Ewelina Błaszczuk przeprowadziła kompleksową analizę molekularną enzymu poli(A) polimerazy (PAPI) jako miejsca docelowego dla potencjalnych leków przeciwprątkowych.

Wybór tematu pracy przez Doktorantkę należy ocenić, jako zasadny naukowo i pożądanym ze względu na aplikacyjny charakter wyników, które dotyczą poszukiwania nowych leków przeciwprątkowych w leczeniu gruźlicy w tym również wielolekoopornej MDRTB i XDR TB. Badania wykonane przez Doktorantkę doskonale wpisują się w główny nurt badań Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierunkiem Prof. dr hab. Jarosława Dziadka wybitnego znawcy zagadnień dotyczących fizjologii i genetyki prątków, co z góry gwarantowało wniesienie znacznego wkładu wiedzy w zaplanowanych badaniach.

Układ pracy jest typowy, zawiera wszystkie rozdziały przyjęte zwyczajowo w pracach doktorskich. We wstępie Autorka opisuje zagadnienia dotyczące epidemiologii gruźlicy wielolekoopornej w tym MDRTB i XDR TB, mechanizmy nabywania lekooporności prątków miejsce działania na komórkę prątków leków I i II linii. Nowe leki przeciwprątkowe będące w różnych fazach badań klinicznych i ich potencjalne miejsce działania na komórkę prątków oraz zagadnienia dotyczące procesu poliadenylacji u Prokariota, aktualny stan wiedzy na temat tego procesu u Mycobacterium oraz procesów naprawczych DNA u *Mycobacterium tuberculosis*.

Chciałabym podkreślić, że wprowadzenie napisane jest przez Doktorantkę w sposób zwięzły, mimo że zakres tematyczny wstępu jest bardzo szeroki.

W pracy doktorskiej mgr Eweliny Błaszczyk głównym celem była ocena za pomocą badań molekularnych potencjalnego miejsca docelowego dla nowych leków przeciwprątkowych jakim może być mykobakteryjne białko PAPI kodowane przez gen *pcnA*. Cel ten realizowano poprzez określenie konieczności obecności genu *pcnA* w szczepie *Mycobacterium tuberculosis* i szybko rosnącym szczepie *Mycobacterium smegmatis*, zbadanie aktywności enzymatycznej białka w warunkach *in vitro*, identyfikację inhibitorów hamujących aktywność poli(A) adenylazy PAPI *in vitro* oraz wewnątrz komórek prątków, badano również potencjalną rolę białka PAPI w procesach naprawy DNA u prątków.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób przejrzysty i jasno wytyczają kierunek prowadzenia badań.

Miejsca docelowe dla nowych leków przeciwprątkowych powinny być unikalne dla organizmów prokariotycznych, niezbędne dla przeżycia komórki przynajmniej w warunkach infekcji a osłabiona żywotność prątków powinna być obserwowana nawet w warunkach inaktywacji tylko części cząsteczek w komórkach bakterii. W badaniach przesiewowych z wykorzystaniem mutagenyzy transpozonowej gen *pcnA* prątków gruźlicy zaklasyfikowano jako potencjalnie niezbędny dla przeżycia prątków w warunkach *in vitro*. Doktorantka w sposób precyzyjny, systematyczny i dobrze zaplanowany weryfikuje niezbędność badanego genu zarówno u prątków gruźlicy jak i u modelowego, szybko rosnącego szczepu *M. smegmatis*. Weryfikacja ta została przeprowadzona z wykorzystaniem metody opartej na procesie homologicznej rekombinacji. Doktorantka nie tylko wykazała, że funkcjonalny gen *pcnA* nie może zostać zastąpiony genem niefunkcyjnym, ale również udowodniła eksperymentalnie, że proces ten jest możliwy po wprowadzeniu do chromosomalnego DNA dodatkowej, funkcjonalnej kopii genu znajdującej się pod kontrolą własnego lub chemicznie regulowanego promotora. Dodatkowym potwierdzeniem niezbędności genu *pcnA* u mykobakterii była próba usunięcia dodatkowej, funkcjonalnej kopii genu, po inaktywacji genu natywnego, w procesie miejscowo specyficznej rekombinacji, zachodzącym w komórkach prątków z wysoką częstością. W przeprowadzonym cyklu doświadczeń Doktorantka nie tylko wykazała ponad wszelką wątpliwość, że zarówno prątki gruźlicy jak i prątki saprofityczne *M. smegmatis* nie przeżywają bez funkcjonalnego genu *pcnA* ale także

uzyskała niezwykle cenne „narzędzie genetyczne” w postaci warunkowego mutantu *M. smegmatis* z regulowanym poziomem syntezy białka PAPI.

**Dane literaturowe wskazują, że białko PAPI nie występuje w proteomie *Bacillus subtilis* a u *E. coli* kodujący gen może zostać inaktywowany bez znaczącego wpływu na przeżywalność bakterii, w tym kontekście chciałabym poznać przemyślenia Doktorantki dotyczące mechanizmów wpływających na niezbędność genu *pcnA* u mykobakterii.**

Analiza densytometryczna hodowli wykazała, że rekombinowany, warunkowy mutant *M. smegmatis* charakteryzował się obniżonym poziomem białka PAPI o około 50% w stosunku do szczepu dzikiego. Analiza morfologii komórek i kolonii mutantu w porównaniu do szczepu dzikiego na pożywkach stałych i płynnych wykazała nieznaczne wydłużenie komórek i zmiany w morfologii kolonii. Zaobserwowano, że obniżenie poziomu białka PAPI spowodowało spowolnienie wzrostu mutantu w porównaniu do szczepu dzikiego wyłącznie na pożywkach o niskiej zawartości składników odżywczych (pożywkach M9 z 0,2% glukozą).

**Mam pytanie do Doktorantki, dlaczego nie stwierdzono różnic we wzroście mutantu i szczepu dzikiego *Mycobacterium smegmatis* na pożywkach wzbogaconych? Jaki według Doktorantki jest mechanizm tego zjawiska?**

W oparciu o opracowany przez Doktorantkę w pracy test enzymatyczny badania aktywności białka PAPI zbadano jego aktywność poliadenylazy w obecności inhibitorów innych polimeraz takich jak rifampicyna, doksorubicyna, suramina, thiolutin, kordicepin. Działanie hamujące tych związków badano również w stosunku do komórek szczepu dzikiego i mutantu *Mycobacterium smegmatis* o obniżonym poziomie białka PAPI. Test enzymatyczny oraz zwiększona wrażliwość szczepu mutantu wskazała na działanie badanych inhibitorów (z wyjątkiem suraminy) na aktywność białka PAPI in vitro oraz w komórkach bakterii. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę wskazują, że opracowany w pracy test enzymatyczny oraz rekombinowany szczep *M. smegmatis* mogą być stosowane w poszukiwaniu nowych inhibitorów białka PAPI z wykorzystaniem bibliotek związków chemicznych. Opracowana przez Doktorantkę metoda jest szybka w wykonaniu, nie wymaga zastosowania specjalistycznego sprzętu oraz pracowni izotopowej a jednocześnie zapewnia wysoką czułość oznaczeń.

Ponadto, stwierdzono, że związki o aktywności inhibitorowej w stosunku do białka PAPI powodowały zahamowanie wzrostu *Mycobacterium tuberculosis*. Analiza wartości MIC w testach in vitro i in vivo oraz dane literaturowe wskazują jednak, że poli(A) polimeraza w komórkach prątków nie jest jedynym miejscem docelowym dla badanych inhibitorów.

Mam nadzieję, że rozpoczęte przez Doktorantkę badania będą dalej kontynuowane i w najbliższym czasie poznamy mechanizmy jakie zostają uruchomione w komórkach prątków po inaktywacji białka PAPI i jego roli w procesach naprawy DNA

**Mam pytanie czy wyniki tych badań mogą mieć bezpośrednie przełożenie na prątki będące w fazie latentnego zakażenia?**

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane w 3 dobrze zredagowanych wnioskach.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Rozdział ten napisany jest w sposób jasny i szczegółowy umożliwiając powtórzenie opisanych metod molekularnych przez innego badacza.

Dyskusja wyników zawarta jest w 16 stronicowym omówieniu. Doktorantka w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów. Pracę mgr Eweliny Błaszczuk kończy bardzo bogaty spis cytowanego piśmiennictwa (247 pozycji). Jest to nowe, wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo, pochodzące głównie z ostatnich lat. Jako Recenzent chcę podkreślić dużą staranność w przygotowaniu pracy.

W posumowaniu oceny pracy doktorskiej pragnę podkreślić, iż stanowi ona oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Jest dowodem jej pracowitości, umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Poza tym chciałabym podkreślić, że jest to pierwsza analiza molekularna roli białka PAPI jako nowego celu dla leków przeciwprątkowych i próba oceny jego znaczenia dla funkcjonalności komórki *Mycobacterium*.

Przed przygotowaniem przez Doktorantkę pracy do druku proponuję wprowadzenie kilku zmian merytorycznych i redakcyjnych.

#### **Wstęp**

Str 19 nie ma modelu zwierzęcego gruźlicy

Str 20 u wielu gatunków, a u niektórych biologia postępuje się językiem precyzyjnym

Str. 23 **sygnaling komórkowy** - Proszę Autorkę o wyjaśnienie użycia tego terminu

Str. 28 9 wiersz od dołu Nie rozumie tego opisu Centralna część

Str. 31 białka konserwowane w szczepach klinicznych MTB??

### **Materiały**

Str. 47 co to są substancje nieantybiotyczne ?

### **Wnioski**

Moim zdaniem we wniosku 1 brakuje określenia do czego jest niezbędne biało PAPI dla prątków

Drobiazgowo uwagi recenzenta, które przekazałam osobiście Doktorantce nie umniejszają wartości pracy.

Mając na uwadze bardzo zaawansowany warsztat pracy Doktorantki z zakresu biologii molekularnej, swobodę z jaką postępuje się nowoczesnymi technikami oraz unikalne i oryginalne w skali światowej wyniki badań naukowych stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami.

**Gratulując Doktorantce i Promotorowi zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Biorąc pod uwagę wysoka wartość merytoryczną Rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.**

Z poważaniem

prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć