

INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC

Zakład Mikrobiologii

Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy

Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

01-138 Warszawa ul. Płocka 26

Tel./ fax. + 22 4312182, e- mail: e.kopec@igichp.edu.pl



Warszawa, 09.01.2020 r.

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

Kierownik Zakładu Mikrobiologii IGiCHP

Warszawa ul. Płocka 26

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Karoliny Ambroziak pt "Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdtA_S w regulacji procesów metabolicznych u mycobakterii."

Rozprawa doktorska przygotowana podczas Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, wykonana w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Promotor pracy : Profesor dr hab. Jarosław Dziadek,

Promotor pomocniczy : Doktor Renata Płocińska

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy bardzo istotnego zagadnienia jakim jest zdolność adaptacyjna rodzaju *Mycobacterium* do środowiska makroorganizmu w trakcie zakażenia. Tematyka pojętych przez Autorkę badań jest bardzo interesująca nie tylko pod względem poznawczym ale i aplikacyjnym.

Po raz pierwszy dwuskładnikowy system regulacyjny (two-component system, TCS) został opisany w 1986 roku przez Nixona i wsp w pracy dotyczącej wysokiej konserwatywności sekwencji aminokwasowych. W tym samym roku Ninfa AJ i Magasanik B w pracy opublikowanej w Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

America stwierdzili, że dwuskładnikowy system regulacyjny może kontrolować asymilację azotu u bakterii poprzez fosforylację białek. Te dwa odkrycia zapoczątkowały ogromne zainteresowanie tematyką dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, które trwa do dnia dzisiejszego.

Dwukomponentowy systemu regulacyjny występuje powszechnie w komórkach bakterii i odgrywa ważną rolę w regulacji procesów życiowych takich jak: koniugacja, sporulacja, tworzenie biofilmu, bioluminescencja, synteza antybiotyków. System ten uczestniczy również w regulacji szlaków metabolicznych i bierze udział w transporcie substancji odżywczych i jonów oraz umożliwia adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych takich jak temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne poprzez regulację ekspresji określonych genów. Do chwili obecnej opisano kilkaset tego typu systemów, przy czym funkcja wielu z nich nie została jeszcze dokładnie poznana. Wyniki badań opublikowane w ostatnim okresie czasu zwracają uwagę, że dwuskładnikowe systemy regulacyjne mogą stanowić nowe potencjalne miejsca działania leków. Ma to szczególne znaczenie w erze narastającej lekooporności drobnoustrojów na obecnie znane antybiotyki i chemioterapeutyki. Ponadto warto podkreślić, że lekooporność prątków gruźlicy na leki przeciwprątkowe jest ważnym problemem zdrowia publicznego, który zagraża postępowi w leczeniu i kontroli nad tą zakaźną chorobą na całym świecie. Sama choroba, w tym szczególnie jej formy lekooporne są bardzo niebezpieczne, zagrażają zdrowiu i życiu człowieka. W skali kraju powodują ogromne wydatki spowodowane absencją chorobową, długimi pobytami w szpitalu oraz bardzo wysokimi nakładami finansowymi pokrywanymi z budżetu państwa na leczenie chorych. Jeden chory prątkujący może zakazić rocznie około 10-15 osób z otoczenia, w szczególnie sprzyjających warunkach transmisji choroby liczba zakażonych może być dużo większa. Jeden prątkujący może zakazić nawet kilkaset osób. Ryzyko przeniesienia choroby na inne osoby wzrasta w przypadku gruźlicy odpornej na leki, ponieważ wydłuża się znacznie czas zakaźności chorych.

Badania zaplanowane przez Doktorantkę doskonale wpisują się w aktualną światową tematykę badań dotyczącą nowych leków przeciwprątkowych, ponieważ to właśnie w terapii gruźlicy pilnie potrzebne są nowe leki, i tematykę badań *Promotora* pracy Pana Profesora Jarosława Dziadka, wybitnego specjalisty rodzaju *Mycobacterium*. Tym samym w mojej ocenie wnoszą do niej elementy, które w przyszłości pozwolą na opracowanie nowych

skutecznych leków do leczenia gruźlicy, szczepionek, pozwolą zrozumieć mechanizm latentnego zakażenia prątkami gruźlicy i przejścia w aktywną postać choroby.

Układ pracy jest typowy, zawiera wszystkie rozdziały przyjęte zwyczajowo w pracach doktorskich. We wstępie Autorka opisała rodzaj *Mycobacterium*, jego epidemiologię, mechanizmy lekooporności, schematy leczenia gruźlicy, scharakteryzowała dwukomponentowe i niekanoniczne systemy transdukcji sygnału prątków. Chciałabym podkreślić, że wprowadzenie napisane jest przez Doktorantkę w sposób zwięzły, mimo że zakres tematyczny wstępu jest bardzo szeroki.

Wywiązując się z obowiązku Recenzenta muszę jednak zgłosić pewne uwagi.

Str 22 Proponuję zweryfikować w oparciu o źródłową literaturę definicję gruźlicy opornej na leki, między innymi TDR

Str 27 Zweryfikować definicję lekooporności pierwotnej

Str 33 Przyczyn nieskutecznego leczenia gruźlicy jest zdecydowanie więcej (nie tylko mechanizmy lekooporności)

Str 33 *Mycobacterium tuberculosis* jest naturalnie wrażliwy na leki przeciwprątkowe

Głównym celem pracy mgr Karoliny Ambroziak było określenie udziału histydynowej kinazy PdtA oraz białka regulatorowego PdtA_R w regulacji procesów metabolicznych prątków.

Główny cel pracy był realizowany poprzez:

1. Konstrukcję ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtaS*.
2. Globalną analizę transkryptomów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtaS*.
3. Globalną analizę metaboliczną z wykorzystaniem technologii mikromacierzy fenotypowych dla szczepu Δ *pdtaS M. smegmatis*.
4. Weryfikację danych otrzymanych z badań przesiewowych dotyczących zwiększonej wrażliwości szczepu Δ *pdtaS M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe oraz zwiększonej oporności na tetracyklinę, poprzez określenie wartości MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost) z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Alamar blue.
5. Badanie mechanizmów molekularnych związanych z obserwowanymi zmianami w lekooporności szczepu Δ *pdtaS M. smegmatis*, poddanie analizie ilościowej i jakościowej składu rybosomów, jako miejsca docelowego badanych klas antybiotyków.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób przejrzysty i jasno wytyczają kierunek prowadzenia badań, są starannie dopasowane do założonych celów.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań, które posłuży do realizacji poszczególnych etapów pracy. Jako Recenzent chciałabym podkreślić zastosowany przez Doktorantkę w pracy warsztat badawczy, na który składają się metody z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej i biochemii oraz badania analityczne z zastosowaniem **spektakularnej metody spektrometrii mas**. Metodyka badań wykorzystanych w pracy opisana jest w sposób jasny i precyzyjny, umożliwiając ich odtworzenie w innym laboratorium. Szeroki wachlarz zastosowanych metod świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego.

Identyfikacja procesów metabolicznych, który potencjalnie mogłyby regulować system PdtaS/R w komórkach *Mycobacterium*, została przez Autorkę zaprojektowana poprzez skonstruowanie zmutowanych szczepów *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* pozbawionych zdolności do syntezy funkcjonalnego białka PdtaS.

W wynikach Doktorantka stwierdziła, że mutanty szczepu pozbawione funkcjonalnego białka PdtaS wykazywały zmniejszoną aktywność metaboliczną w obecności aminoglikozydów (zwiększoną wrażliwość) i zwiększoną oporność na tetracyklinę. Wykazano, że brak funkcjonalnego białka PdtaS wpływa na zmniejszenie wydajności translacji oraz że proces translacji w komórkach mutantu Δ pdtaS *M. smegmatis* jest mniej wrażliwy na obecność tetracykliny. Obserwowany efekt wynika prawdopodobnie z modyfikacji w składzie rybosomów mutantu Δ pdtaS *M. smegmatis* a zmodyfikowany skład rybosomów może skutkować większą wrażliwością prątków na antybiotyki skierowane przeciwko podjednostce 30S.

Realizując kolejne cele Doktorantka zbadła wydajność oddechową mutantu za pomocą testów redukcji Alamar blue oraz TTC. W pracy nie wykazano istotnych zmian w aktywności oddechowej pomiędzy mutantem *M. smegmatis* a szczepem typu „dzikiego”.

Ponadto Autorka wykazała, że brak funkcjonalnego białka PdtaS nie wpływa na proces przeżywalności prątków w obecności reaktywnych form tlenu lub azotu.

Jakie mechanizmy umożliwiają *Mycobacterium* przeżycie w makroorganizmie w obecności reaktywnych form tlenu?

Globalna analiza transkryptomów szczepów mutantów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* wykazała szereg zmian na poziomie transkryptów genów kodujących pompy wielolekowej co sugeruje, że brak funkcjonalnego białka PdtA5 może wpływać na zmianę wrażliwości szczepów prątków na antybiotyki. Wykazano zwiększone MIC dla INH Δ pdtA5 *M. smegmatis* oraz trzykrotnie niższą aktywność katalazy niż w przypadku szczepu kontrolnego.

Mam pytanie do Doktorantki, czy zna inne mechanizmy oporności *Mycobacterium* na INH ?

Wyniki badań Doktorantki stanowią oryginalny wkład do badań naukowych dotyczących nowych metod walki z gruźlicą (leki , szczepionki).

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane we wnioskach.

Jako Recenzent uważam, że tak rozległy zakres pracy, zawierający ogromną ilość ciekawych wyników został podsumowany w zbyt małej liczbie wniosków (tylko dwa). Reszta wyników zawarta została w tzw. obserwacjach, które moim zdaniem można było sformułować jako ostateczne wnioski.

Dyskusja wyników zawarta jest w 10 stronicowym omówieniu. Doktorantka w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów.

Pracę mgr Karoliny Ambroziak kończy bogaty spis cytowanego piśmiennictwa (126 pozycji). Jest to nowe, wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo, pochodzące głównie z ostatnich lat.

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

Proszę Autorkę o precyzyjne określanie w tekście sformułowań większa > lub < mniejsza lekooporność. Porównujemy dane wartości ze szczepem wzorcowym, na przykład

porównanie uzyskanej wartości MIC ze szczepem wzorcowym umożliwia czytelnikowi ocenę skali tego zjawiska.

Str 33 Nie stosujemy określenia utajona gruźlica, jest to zakażenie latentne . Zastosowanie terminu gruźlica sugeruje aktywną postać choroby.

Nie stosujemy terminu nawracająca TB tylko TB nabyta, popierwotna lub wtórna.

Badając mechanizmy oporności Mycobacterium na leki interesuje nas lekooporność, a nie wrażliwość na leki.

Str 111 Mikromacierze fenotypowe wykazały, że aktywność metaboliczna mutanta szczepu *M. smegmatis* jest **zwiększona** w porównaniu do szczepu kontrolnego, natomiast klasyczne metody mikrobiologiczne wykazały **zwiększoną wrażliwość** zmutowanego szczepu na dihydrostreptomycynę. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, czy porównujemy szczepy (mutanta i kontrolny), czy różne metody?

Str 118 „streptomycyna, kanamycyna, izonizyd i kapreomycyna są lekami stosowanymi w leczeniu lekoopornej gruźlicy”.

Zgodnie z zaleceniami ECDC i ERS z 2018 roku, na podstawie nowych danych naukowych dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa, leki stosowane w leczeniu MDR-TB i RR-TB dzieli się obecnie tylko na 3 grupy. Zrezygnowano ze stosowania kanamycyny i kapreomycyny, ponieważ ich dołączenie zwiększa ryzyko niepowodzenia leczenia i wznowy gruźlicy. Do leków pierwszego wyboru należą lewofloksacyna albo moksyflokscacyna, bedakilina i linezolid..

Moje uwagi w niczym nie umniejszają wysokiej oceny i wartości merytorycznej przedstawionej mi do recenzji pracy Pani magister Karoliny Ambroziak , która jest oryginalną wartością Jej dorobku naukowego.

Podsumowanie

Jako Recenzent stwierdzam, że zaplanowane i przeprowadzone przez magister Karolinę Ambroziak badania wskazują na to, że jest ona dojrzałym i samodzielnym pracownikiem naukowym, a wyniki Jej badań stanowią istotny wkład w rozwoju badań dotyczących nowych terapii przeciwprątkowych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 5 z późn. zm.).

Pracę przedstawioną mi do recenzji oceniam pozytywnie i zwracam się do Wysokiej Rady Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktorantki mgr Karoliny Ambroziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę złożony warsztat badawczy, dużą wartość poznawczą i aplikacyjną otrzymanych wyników wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Ambroziak.

Z poważaniem

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

