

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel

Badania nad biosyntezą oraz aktywnością prozapalną form bakteriocyny peptydowej BAcSp222

Rozprawa doktorska mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką dr hab. Pawła Maka.

We wprowadzeniu do rozprawy podsumowany jest dorobek naukowy doktorantki z precyzyjnym wskazaniem prac stanowiących podstawę rozprawy. Są nią wyniki opublikowane w trzech artykułach naukowych, w których doktorantka jest pierwszą autorką.

„Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of Succinylated Forms of Bacteriocin BacSp222” opublikowano w International Journal of Molecular Sciences, „Bacteriocin BacSp222 and Its Succinylated Forms Exhibit Proinflammatory Activities Toward Innate Immune Cells” w Journal of Inflammation Research, a “BacSp222 bacteriocin as a novel ligand for TLR2/TLR6 heterodimer” w Inflammation Research.

Wszystkie te czasopisma mają stosunkowo wysoki współczynnik wpływ (Impact Factor, IF). Publikacje stanowiące podstawę rozprawy zostały już zacytowane w innych pracach naukowych, co świadczy o zainteresowaniu środowiska naukowego przedstawionymi w nich rezultatami prac badawczych. Dla każdej z publikacji dołączone jest oświadczenie opisujące dokładnie, które z prezentowanych wyników są autorstwa mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel i jaki był Jej udział w przygotowaniu poszczególnych artykułów. Oświadczenia pozostałych współautorów nie budzą zastrzeżeń, co do zadeklarowanej kontrybucji doktorantki. Poza publikacjami, wyniki prac doktorantki były prezentowane na konferencjach naukowych, w tym międzynarodowych.

Częścią rozprawy są także wyniki, które nie zostały jeszcze opublikowane. Są one precyzyjnie opisane i przedyskutowane w oddzielnym podrozdziale rozprawy. Są to w większości wyniki negatywne, i tylko z tego powodu nie znalazły się w publikacjach. Niemniej, są one cenne dla

zrozumienia badanych zagadnień, doboru czy modyfikacji stosowanych metod i interpretacji pozostałych wyników.

Warto podkreślić, że doktorantka jest także współautorką czterech innych publikacji i trzech prezentacji konferencyjnych nie związanych z tematyką rozprawy. W trakcie studiów doktoranckich była zaangażowana w realizację dużego projektu badawczego, ale także samodzielnie prowadziła swój własny grant finansowany z środków uczelni. Świadczy to niewątpliwie o znaczącej aktywności naukowej doktorantki.

Na pochwałę zasługuje przemyślny, jeśli chodzi o dobór informacji, i bardzo dobrze przedstawiony wstęp teoretyczny. Doktorantka stopniowo wprowadza czytelnika do tematyki swoich badań przedstawiając w pierwszej kolejności ogólne wiadomości o bakteriocynach, ich systematyce, właściwościach skupiając się w kolejnych podrozdziałach na coraz bardziej szczegółowych opisach tych obszarów wiedzy, których bezpośrednio dotyczą prowadzone przez nią badania. Przystawione zostały także informacje wprowadzające do zagadnień związanych z odpowiedzią zapalną wywołaną przez badaną bakteriocynę. Niewątpliwie trzeba mieć olbrzymią wiedzę i dogłębne zrozumienie problematyki, aby w sposób tak syntetyczny, a jednocześnie wyczerpujący przedstawić naukowe tło swoich badań.

Cele pracy, zarówno te ogólne jak i szczegółowe, są precyzyjnie sformułowane, a przedstawione wyniki dowodzą, że zostały one osiągnięte.

W paragrafie przedstawiającym podstawowe informacje o bakteriocynie BacSp222 i odnoszącym się do wcześniejszych badań brakuje odniesienia do literatury.

Przystawione w publikacjach i wynikach uzupełniających rezultaty badań stanowią spójną całość, a kolejne publikacje pokazują konsekwencję w poszukiwaniu odpowiedzi na pojawiające się pytania i są doskonałą ilustracją rozwoju podjętej przez doktorantkę tematyki badawczej.

W pierwszej publikacji „Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of Succinylated Forms of Bacteriocin BacSp222” opisane zostały modyfikacje BacSp222 oraz sprawdzony ich wpływ na aktywność bakteriocyny, która była monitorowana z pomocą testu pozwalającego na pomiar strefy zahamowania wzrostu badanych bakterii. Jak sami autorzy przyznają, nie zaobserwowali zależności pomiędzy stężeniem badanych substancji a wielkością strefy hamowania wzrostu. *Czy testowane były inne sposoby monitorowania aktywności bakteriocyny? Jeśli nie, to dlaczego i jakie testy mogłyby być wykorzystane?*

Okazało się, że tylko dwie z lizyn obecnych w peptydzie podlegały bursztynylacji. Z wykorzystaniem NMR określona została struktura BacSp222. *Czy położenie poszczególnych lizyn w strukturze peptydu mogłoby wyjaśnić wybiórczość pozycji tych modyfikacji? Czy są jakieś inne przesłanki tłumaczące, dlaczego pozostałe lizyny nie są modyfikowane?*

Wykazano, że bursztynylacja jednej lub dwóch lizyn obniża efektywności działania antybakteryjnego bakteriocyny i zaproponowano, że jest to spowodowane zmianą ładunku peptydu. *Czy został zmierzona/policzona wartość ładunku powierzchniowego peptydu przed i po modyfikacjach? Ponadto zaobserwowano, że modyfikacje hamowały aktywność bakteriocyny, ale w różnym stopniu w zależności od gatunku bakterii. Czy istnieje jakieś wytłumaczenie czy hipoteza tłumacząca przyczynę tak zróżnicowanego efektu modyfikacji zależnego od gatunku?*

W nieopublikowanych wynikach uzupełniających tę publikację przedstawiono próby bursztynylacji innych bakteriocyn. *Czy w przypadku nizyny i lizostafiny Sp222 przeprowadzone były badania pozwalające na określenie stopnia bursztynylacji i wpływu tej modyfikacji na aktywność tych białek?*

Ponadto, w publikacji opisano mechanizm bursztynylacji i czynniki wpływające na poziom tego procesu w komórkach bakterii. Sprawdzono też wpływ bakteriocyny i jej bursztynylacji na cytotoksyczność w stosunku do różnego typu komórek eukariotycznych, co doprowadziło do wniosku, że BacSp222 posiada pewne cechy czynnika wirulencji i może wpływać na odpowiedź immunologiczną gospodarza.

Odpowiedź na te pytania została przedstawiona w publikacji „Bacteriocin BacSp222 and Its Succinylated Forms Exhibit Proinflammatory Activities Toward Innate Immune Cells”, w której potwierdzono prozapalne właściwości bakteriocyny na różnych typach komórek eukariotycznych. Wykazano wpływ bakteriocyny na produkcję tlenku azotu (NO) i ekspresję jego syntazy (iNOS), sprawdzono profil cytokin indukowanych obecnością bakteriocyny i produkcję reaktywnych form tlenu (ROS). Dla porównania do testów włączono też nizynę, wykazując unikalność prozapalnych właściwości BacSp222 i znaczenie modyfikacji bakteriocyny w tych procesach. Otrzymane wyniki potwierdziły prozapalne właściwości badanej bakteriocyny i wskazały zaangażowane mechanizmy. Kolejnym naturalnym pytaniem było pytanie o receptory bakteriocyny.

Poszukiwania receptorów bakteriocyny podsumowano w ostatniej w cyklu publikacji „BacSp222 bacteriocin as a novel ligand for TLR2/TLR6 heterodimer”. Dzięki zastosowaniu różnorodnych metod, w tym mikroskopii konfokalnej odkryto, że BacSp222 wiąże się z heterodimerem TLR2/TLR6 a następnie ulega internalizacji indukując procesy prozapalne, w które zaangażowane

są MyD88 i jądrowy czynnik NF- κ B. Wyniki te są kontynuacją wcześniejszych badań i sprawiają, że właściwości i mechanizmów działania bakteriocyny BacSp222 są coraz lepiej poznane, a przez to też rozumiane.

Dyskusja zaprezentowanych w rozprawie wyników jest przeprowadzona bardzo logicznie i systematycznie, poparta odniesieniami do aktualnej literatury. Wyniki dotyczące poszczególnych, badanych zagadnień dyskutowane są w kontekście dostępnej wiedzy. Co ważne, w oparciu o przeprowadzoną analizę wyciągane są wnioski, ale także zadawane ważne pytania, które wymagają dalszych badań, aby jeszcze lepiej poznać nowo opisane mechanizmy działania bakteriocyny BacSp222.

Oddzielne podrozdziały poświęcone zostały przedyskutowaniu możliwości wykorzystania uzyskanej wiedzy na temat samej bakteriocyny i mechanizmów jej działania. Potencjał ten jest przedstawiony nie tylko w kontekście wiedzy dostępnej w publikacjach, ale także wynikający z analizy informacji na temat prowadzonych badań klinicznych. W przypadku rozwiązań z potencjałem aplikacyjnym warto byłoby też przeanalizować związane z danym zagadnieniem zgłoszenia patentowe, które zostały opublikowane. Dyskusja nad potencjałem aplikacyjnym bakteriocyny dotyczy jej właściwości prozapalnych, potencjalnego wykorzystania tego peptydu jako adjuwanta. W dyskusji nie poświęcono zbyt wiele miejsca na przedstawienie potencjału aplikacyjnego właściwości bakteriobójczych bakteriocyny BacSp200. *Chciałabym prosić o podzielenie się własną opinią na temat przyszłości bakteriocyn jako alternatywy dla antybiotyków czy innych środków antybakteryjnych. Jakie są szanse i korzyści, a jakie ograniczenia i zagrożenia z tym związane?*

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel chciałam podkreślić, że praca ta opiera się na dobrze udokumentowanych, oryginalnych i bardzo ciekawych wynikach. Sama rozprawa została przygotowana z dbałością o szczegóły, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim.

Wniosek końcowy

W rozprawie doktorskiej mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel przedstawiono wyniki prac, które zostały opublikowane jako cykl artykułów naukowych opisujących aktywności bakteriobójcze i prozapalne bakteriocyny BacSp222 i jej modyfikacji. Tematyka rozprawy jest bardzo spójna, a uzyskane wyniki w sposób znaczący przyczyniają się do poznania nie tylko nowych właściwości bakteriocyn, ale także zrozumienia mechanizmów ich aktywności i regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Po wnikliwej analizie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. nm.).

Wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników, które zostały przedstawione w rozprawie wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel.

Warszawa 21.09.2023



Dr hab. Izabela Sabała