

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

Warszawa 26.03.2021 r.

Prof. dr hab. n.med Ewa Augustynowicz-Kopec
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
Zakład Mikrobiologii

Recenzja

pracy doktorskiej magister Malwiny Kawki pod tytułem „Interakcja *Mycobacterium tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A”

Gruźlica (TB) jest chorobą zakaźną, której czynnikiem etiologicznym są gatunki prątków należące do *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Pomimo podjętych na świecie znacznych wysiłków mających na celu kontrolę jej rozprzestrzeniania się, nadal pozostaje wyzwaniem dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że obecnie jedna trzecia populacji ludzkiej zakażona jest prątkiem gruźlicy. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2019 roku zarejestrowano 10,4 mln przypadków gruźlicy, w tym około 600 tysięcy przypadków gruźlicy wywołanej przez szczepy odporne na co najmniej dwa główne leki przeciwprątkowe ryfampicynę i izoniazyd (MDR-TB). Do najważniejszych przyczyn stale pogarszającej się sytuacji epidemiologicznej gruźlicy na świecie należą: złe programy zwalczania choroby i niedostateczna ich realizacja, lekceważenie problemu w krajach rozwiniętych, brak środków na leczenie w krajach rozwijających się, rozprzestrzenienie się wirusa HIV oraz zjawisko

lekooporności prątków, uznane przez ekspertów WHO za jedną z ważniejszych przyczyn nasilenia gruźlicy we współczesnym świecie. Obecna sytuacja epidemiologiczna jest również konsekwencją likwidacji w wielu krajach systemów opieki zdrowotnej i programów walki z gruźlicą, które tak skutecznie przyczyniły się do jej kontrolowania przez większość XX wieku.

Do transmisji prątków gruźlicy dochodzi głównie drogą aerogenną. Po wniknięciu *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) do organizmu gospodarza dochodzi do złożonej odpowiedzi immunologicznej i uruchomienia przede wszystkim mechanizmów odporności wrodzonej. W wyniku tej pierwszej linii obrony, na którą składają się komórki nabłonka dróg oddechowych i „profesjonalne” fagocyty (neutrofile, monocyty i komórki dendrytyczne) u około 90% populacji dochodzi do całkowitego usunięcia patogenu z dróg oddechowych i infekcja zostaje przerwana. W przypadku dysfunkcji odporności wrodzonej fagocyty ulegają zakażeniu, a prątki zaczynają aktywnie namnażać się w makrofagach, przedostawać się, wędrować do pobliskich komórek, w tym komórek nabłonka i śródbłonka, w ciągu kilku tygodni wchodząc w fazę wzrostu wykładniczego, prowadzącego do dużego obciążenia bakteryjnego w zakażonym organizmie. Sukces w rozprzestrzenianiu się i transmisji Mtb z gospodarza do gospodarza na przestrzeni tysięcy lat wynika z jego niezwyklej zdolności do usypiania i hamowania mechanizmów, które powinny wyeliminować go w makrofagach na początku zakażenia.

Definicja przypadku gruźlicy wg WHO zakłada konieczność mikrobiologicznego potwierdzenia choroby, czyli wyizolowania czynnika sprawczego – bakterii należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex (M.tbc), określenia gatunku i wykonania testu lekooporności. Kontrola nad programami zwalczania gruźlicy wymaga szybkiej identyfikacji chorego prątkującego, podjęcia właściwego leczenia wraz z monitorowaniem postępów terapii przeciwpątkowej, co zapobiega transmisji prątków gruźlicy w środowisku. Z danych statystycznych wynika, że jeden chory na gruźlicę zakaża około 15 osób rocznie. Osiągnięcie złotego standardu, jakim jest potwierdzenie mikrobiologiczne metodą hodowli, w diagnozowaniu gruźlicy jest procesem trudnym ze względu na długi czas generacji rodzaju *Mycobacterium* wynoszący około 18 h. Powolny wzrost prątków na podłożach bakteriologicznych umożliwia jego obserwację dopiero po kilku dniach na pożywkach płynnych albo po kilku tygodniach na pożywkach stałych.

W chwili obecnej istnieje pilna potrzeba lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów patogenności prątków gruźlicy. Pozwoli to na szybsze opracowanie nowych, tak potrzebnych leków i szczepionek. Wiele uwagi poświęca się również biomarkerom, które umożliwiłyby różnicowanie pomiędzy chorym z aktywną postacią gruźlicy a osobą zdrową, nie zakażoną, które normalizowały się pod wpływem leczenia oraz przewidywały końcowy efekt kliniczny w różnych populacjach chorych. Lepsze zrozumienie procesów chorobowych związanych z tą chorobą zakaźną może doprowadzić do opracowania skutecznych narzędzi zdolnych do jej pokonania.

Z dużym zainteresowaniem podjęłam się recenzji pracy doktorskiej magister Malwiny Kawki, dotyczy ona bowiem bardzo istotnego nurtu prowadzonych obecnie na świecie badań dotyczących wyjaśnienia nieznanymi mechanizmami interakcji prątków gruźlicy z elementami odporności wrodzonej organizmu gospodarza.

Wybór tematu pracy przez Doktorantkę należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądany ze względu na aplikacyjny charakter uzyskanych wyników zarówno w poszukiwaniu nowych leków przeciwprątkowych jak i nowych metod wspomagających identyfikację chorego z aktywną postacią gruźlicy. Praca została wykonana w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej w Zakładzie Immunoparazytologii, której Kierownikiem jest Pani dr hab. Bożena Dziadek, prof. Uniwersytetu Łódzkiego, Promotor pracy. Wykonane badania doskonale wpisują się w zagadnienia dotyczące interakcji gospodarz – drobnoustroje chorobotwórcze oraz poszukiwania nowych miejsc docelowych dla leków przeciwprątkowych w komórce prątka gruźlicy, którymi od wielu lat zajmuje się zespół Pani Profesor.

Praca doktorska jest monografią opartą o własne oryginalne badania i realizowaną w ramach projektu badawczego OPUS 12, 2016/23/B/NZ7/01204 oraz Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Łódzkiego, których uczestnikiem była Pani magister Malwina Irena Kawka.

We wstępie Autorka opisuje szczegółowo i w bardzo przystępny sposób wiele zagadnień dotyczących gruźlicy takich jak: epidemiologia, wybrane elementy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej w patogenezie gruźlicy, interakcje prątków gruźlicy z rozpuszczalnymi, krążącymi receptorami PRRs, interakcje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i heparyną oraz rolę w patogenezie zakażeń *Mycobacterium tuberculosis* surowiczego amyloidu A. Chciałabym podkreślić, że wprowadzenie napisane jest przez Doktorantkę w sposób zwięzły, mimo że zakres tematyczny wstępu jest bardzo szeroki.

Celem niniejszych badań była ocena interakcji pomiędzy *Mycobacterium tuberculosis* a ludzkim surowiczym amyloidem A oraz określenie jej znaczenia w ludzkich makrofagach we wczesnych etapach zakażenia. Cel ten zrealizowano w pracy w niezwykle ciekawy sposób poprzez doświadczalną weryfikację sformułowanych hipotez badawczych.

Cele pracy oraz cztery hipotezy badawcze zostały sformułowane w sposób przejrzysty i jasno wytyczają kierunek prowadzenia badań.

Hipoteza 1: *Mycobacterium tuberculosis* posiada zdolność wiązania ludzkiego surowiczego amyloidu A

Sposób weryfikacji:

- a) analiza interakcji prątka gruźlicy z ludzkim, rekombinowanym A-SAA1 (hr A-SAA1)
- b) ocena swoistości wiązania hrA-SAA1 przez żywe komórki *M. tuberculosis*

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że komórki *Mycobacterium tuberculosis* wiążą ludzki rekombinowany amyloid A hrA-SAA1. Ponadto stwierdzono, że wiązanie to jest istotne statystycznie wraz ze wzrostem stężenia badanego białka ostrej fazy. Natomiast dla prątków *Mycobacterium smegmatis* intensywność tego wiązania z amyloidem A była istotnie niższa. Podobne obserwacje dla tych dwóch gatunków prątków dotyczyły swoistości wiązania z hrA-SAA1. Swoistość stwierdzono tylko w przypadku *Mycobacterium tuberculosis*.

Hipoteza 2: Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* warunkowane jest przez ligand/ligandy stanowiące komponent/komponenty komórek tego wewnątrzkomórkowego patogenu

Sposób weryfikacji:

- a) izolacja i identyfikacja komponentu/komponentów komórek prątku gruźlicy zaangażowanych w interakcje tego drobnoustroju z hrA-SAA1
- b) określenie powinowactwa wiązania hrA-SAA1 przez zidentyfikowane ligandy prątku gruźlicy

Doktorantka stwierdziła, że badane białko ostrej fazy wiązane jest przez białka komórki prątków gruźlicy o masie cząsteczkowej w zakresie 55-70kDa. Za pomocą analizy spektrometrycznej zidentyfikowano sześć potencjalnych ligandów prątków gruźlicy warunkujących interakcje hrA-SAA1. Wszystkie ligandy były komponentami wykrywanymi we frakcji białek membranowych prątków. Do dalszych badań Autorka wytypowała białko Rv1308 będące podjednostką regulatorową enzymu katalizującego syntezę ATP z ADP w warunkach błonowego gradientu protonów oraz białko Rv2477c, które pełni funkcję wiążącego ATP transportowego białka typu ABC, biorącego aktywny udział w błonowym transporcie związków makrolidowych. Autorka przy zastosowaniu techniki Western blot potwierdziła zdolność obu białek do wiązania z amyloidem A. Badania z zastosowaniem powierzchniowego rezonansu plazmowego wykazały, że oba ligandy prątkowe wiążą się swoiście z badanym białkiem ostrej fazy. Ponadto stwierdzono, że rekombinowane białko Rv1308 (rAtpA) charakteryzuje się wyższym powinowactwem do wiązania białka ostrej fazy w porównaniu do rekombinowanego białka Rv2477c (rABC).

Hipoteza 3: Wiązanie ludzkiego surowiczego amyloidu A przez *M. tuberculosis* moduluje przebieg wczesnych etapów infekcji ludzkich makrofagów

Sposób weryfikacji:

- a) określenie wpływu wiązania hrA-SAA1 na procesy adhezji i wnikania prątku gruźlicy do ludzkich makrofagów
- b) ocena zaangażowania ligandu/ligandów wiążących hrA-SAA1 we wczesne etapy (adhezja, wnikanie) infekcji ludzkich makrofagów

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka stwierdziła, że interakcja *Mycobacterium tuberculosis* z hrA-SAA1 w fizjologicznym stężeniu białka ostrej fazy nie powoduje istotnych statystycznie zmian we wnikaniu oraz przeżywaniu prątków w komórkach makrofagów. Zmiany te istotne statystycznie zaobserwowano w przypadku stężenia 5- krotnie wyższego

od średniej fizjologicznej wartości stężenia tego białka. Natomiast opsonizacja hrA-SAA1 komórek *Mycobacterium tuberculosis* w tym stężeniu nie powodowała istotnych zmian w procesie adhezji prątków do ludzkich makrofagów. Jednocześnie stwierdzono, w przypadku fagocytów pobranych od 5 dawców, iż opsonizacja komórek *Mycobacterium tuberculosis* hrA-SAA1 w stężeniu 5- krotnie wyższym od średniego stężenia fizjologicznego nie spowodowała istotnych zmian w adhezji prątków do makrofagów. Proces przylegania opłaszczonych komórek prątków do makrofagów pobranych od 5 dawców wykazał duże zróżnicowanie.

Mam pytanie do Doktorantki z czego Jej zdaniem mogły wynikać tak duże różnice w przyleganiu do makrofagów opłaszczonych komórek *Mycobacterium tuberculosis* pobranych od 5 dawców, szczególnego wyjaśnienia moim zdaniem wymaga reakcja fagocytów pobranych od dawcy D1 ?

Czy był przeprowadzony wywiad dotyczący dawców tych komórek?

W celu oceny zaangażowania dwóch białek prątków AtpA i ABC w proces wnikania i namnażania się prątków w komórkach fagocytów Autorka przygotowała rekombinowane mutanty *Mycobacterium tuberculosis* *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑, które charakteryzowały się nadprodukcją docelowego białka. Analiza wyników wykazała, że nadprodukcji w/w białek przez komórki mutantów towarzyszy znamienne statystycznie osłabione wnikanie prątków do ludzkich makrofagów. Autorka zarejestrowała również istotne obniżenie liczby namnażających się wewnątrzkomórkowo rekombinowanych prątków. W celu wyjaśnienia osłabionego wnikania mutantów *MtbAtpA*↑ i *MtbABC*↑ do makrofagów Doktorantka sprawdziła, czy indukowana nadprodukcja białek nie powoduje zmian w poziomie syntezy innych komponentów białkowych prątków. Analiza porównawcza proteomu mutantów wykazała istotne zmiany ilościowe w profilu wielu białek powierzchniowych i warunkujących metabolizm komórkowy. W przypadku mutantu *MtbABC*↑ zidentyfikowano nadprodukcję 22 białek i zmniejszenie biosyntezy 123. Mutant *MtbAtpA*↑ wykazywał nadprodukcję 2 białek i obniżenie biosyntezy 40. Dla obu szczepów stwierdzono istotne zmiany poziomu ekspresji białek, niezbędnych do wzrostu komórek prętka.

Hipoteza 4: Interakcja *M.tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A moduluje odpowiedź funkcjonowania tych bakterii

Sposób weryfikacji:

a) analiza odpowiedzi transkrypcyjnej prątką gruźlicy na wiązanie hrA-SAA1

Za pomocą sekwencjonowania w technologii Illumina Autorka wykazała, że interakcja pomiędzy *Mycobacterium tuberculosis* a badanym białkiem ostrej fazy przy 5 krotnym podwyższonym stężeniu powoduje znamienne statystycznie zmiany w genomie. Zmiany te dotyczyły między innymi wzrostu ekspresji genów kodujących systemy białek transportowych oraz obniżenia poziomu ekspresji genów kodujących endonukleazę IV .

Cele pracy i postawione przez Doktorantkę hipotezy zostały zrealizowane i podsumowane w 8 dobrze zredagowanych wnioskach.

W dyskusji Doktorantka w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów.

Pracę Pani magister Malwiny Kawki kończy bogaty spis cytowanego piśmiennictwa (315 pozycji). Jest to nowe, wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo, pochodzące głównie z ostatnich lat.

Jako Recenzent przed przygotowaniem pracy do druku proponuję wprowadzenie drobnych zmian merytorycznych i redakcyjnych.

Wstęp:

Str. 19 Schemat leczenia gruźlicy lekoopornej według rekomendacji WHO jest zdecydowanie inny niż w przypadku gruźlicy wrażliwej na leki. Nie można użyć stwierdzenia, że schemat leczenia wrażliwej na leki jest nieskuteczny w leczeniu gruźlicy lekoopornej. To są dwa różne schematy leczenia

Wyniki:

Brak podsumowania wyników po wszystkich postawionych hipotezach, szczególnie zbiorczych podsumowań brakuje przy bardzo rozbudowanych wynikach hipotezy 2 i 3.

Moje bardzo niewielkie uwagi, które Doktorantce przekazałam osobiście w niczym nie umniejszają wysokiej wartości pracy, którą oceniam bardzo dobrze.

Jako Recenzent pracy Pani magister Malwiny Kawki chcę podkreślić niezwykle staranność z jaką przygotowana jest ta rozprawa. Na szczególną uwagę zasługuje bogata szata graficzna rycin opracowanych przez Doktorantkę

Praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki i jest dowodem jej umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Zwracam uwagę na fakt, że jest to pierwsza w Polsce ocena interakcji pomiędzy *Mycobacterium tuberculosis* a ludzkim surowiczym amyloidem A. Ponadto chciałabym podkreślić, że Pani magister Malwina Kawka jest współautorką sześciu publikacji IF= 21,48 MNiSW 700 $-h$ -index=2, czterech publikacji popularno – naukowych, trzynastu doniesień zjazdowych i bierze aktywny udział w trzech projektach badawczych co stanowi wyróżniający dorobek na tym etapie Jej kariery naukowej.

Z przedstawionej mi do recenzji pracy jednoznacznie wynika, że sukces *Mycobacterium tuberculosis* w rozprzestrzenieniu się wśród *Homo sapiens* na przestrzeni tysięcy lat wynika z jego niezwyklej zdolności do obalania mechanizmów, które powinny wyeliminować go w makrofagach na początku infekcji. „Wielki manipulator” jakim jest prątek gruźlicy o dużych zdolnościach unikania układu odpornościowego, ciągle pozostaje dużym wyzwaniem dla zgłębiających jego mechanizmy przystosowawcze, sposób oddziaływania na organizm gospodarza i chorobotwórczość naukowców.

Chciałbym podkreślić również duży aspekt aplikacyjny wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Mam nadzieję, że dalsze badania dotyczące *Mycobacterium tuberculosis* prowadzone przez Panią Profesor dr hab. Bożenę Dziadek okażą się pomocne w diagnozowaniu trudnych przypadków gruźlicy. Moim zdaniem białka ostrej fazy mogą okazać się dobrym biomarkerem w tej diagnostyce.

Mając na uwadze bardzo zaawansowany warsztat pracy Doktorantki z zakresu biologii molekularnej, swobodę z jaką posługuje 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 roku z późniejszymi zmianami.

Gratulując Doktorantce i Promotorowi zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani magister Malwiny Kawki 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-Kopec