

Prof. dr hab. Magdalena Strus

Katedra Mikrobiologii UJ CM

Czysta 18

31-121 Kraków



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Ocena

Wydział Lekarski

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Krajewskiej
p.t. " Charakterystyka białka opiekuńczego ClpB(Hsp100)
pochodzącego z patogennej bakterii *Leptospira interrogans*,
etiologicznego czynnika leptospirozy."**

Katedra Mikrobiologii

Leptospira interrogans to czynnik etiologiczny leptospirozy, odzwierzęcej choroby wysoce zakaźnej przebiegającej często pod postacią epidemii wodnych. Rezerwuarem tego zarazka są zwierzęta dzikie, małe ssaki głównie gryzonie (szczury, myszy) oraz zwierzęta domowe (psy) i hodowlane (bydło, świnie, lisy). Źródłem zakażenia jest mocz, wydalany przez zwierzęta chore lub nosicieli stąd epidemie wodne zdarzają się najczęściej głównie w krajach o gorącym klimacie. W 2002 Komisja Taksonomii Leptospir Międzynarodowej Unii Stowarzyszeń Mikrobiologów (*International Union of Microbiological Societies*) ustaliła podział poszczególnych gatunków tej rodziny krętków na trzy grupy: patogenną, saprofityczną oraz grupę o cechach pośrednich. Gatunek *Leptospira interrogans* obejmuje szczepy chorobotwórcze zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt. Szacuje się, że

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

każdego roku na całym świecie występuje ponad 1 milion przypadków ciężkiej leptospirozy u ludzi powodującej około 60 000 zgonów.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Warto zauważyć, że leptospiroza to również poważny problem ekonomiczny w wielu krajach, w tym w Unii Europejskiej. Każdego roku są znaczące straty ekonomiczne spowodowane zaburzeniami reprodukcyjnymi u bydła, owiec, świń i koni związane z leptospirozą. Wiele badań serologicznych i mikrobiologicznych wskazuje na wysoki wskaźnik infekcje i nosicielstwa bezobjawowego u zwierząt hodowlanych i domowych. W Polsce tego rodzaju badania przeprowadzono w 2010 roku na ich podstawie okazało się, że 2% świń hodowanych na terenie naszego kraju ma wysokie miano przeciwciał wskazujących na nosicielstwo tych krętków, natomiast aż 90 % kóz hodowanych w 49 stadach miały wysokie i bardzo wysokie miana.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

W związku z tymi doniesieniami, prawdopodobieństwo wystąpienia leptospirozy u hodowców, lekarzy weterynarii i innych osób mających bezpośredni kontakt z tymi zwierzętami jest bardzo wysokie.

Za chorobotwórczość leptospir odpowiada wiele czynników, które umożliwiają wniknięcie do organizmu, rozprzestrzenienie i adhezję tych patogenów do komórek i białek macierzy gospodarza. Ważnymi czynnikami zjadliwości jest LPS i adhezyny. W swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Joanna Krajewska zajęła się bakteryjnym białkiem opiekuńczym ClpB. Białko to jest niezbędne w zachowaniu wirulencji

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

takich patogenów jak: *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma pneumoniae*, czy *Leptospira interrogans*. W swojej pierwszej publikacji zatytułowanej: „*AAA+ClpB chaperone as a potential virulence factor of pathogenic microorganisms: Other aspect of its chaperone function*” doktorantka zwróciła uwagę na wyniki prac kilku zespołów badawczych, które to zespoły wykorzystując zwierzęta doświadczalne udowodniły, iż bakterie *L.monocytogenes* oraz *L.interrogans* pozbawione aktywnego białka ClpB tracą zjadliwość i co ważniejsze stają się bardziej podatne na stres oksydacyjny i termiczny. Autorka zwróciła również uwagę na właściwości immunogenne białka ClpB, które jest nie tylko produkowane podczas infekcji gospodarza, ale również czynnie uczestniczy w zainicjowaniu tego procesu.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Autorka rozprawy słusznie zwróciła uwagę na nową funkcję białka ClpB, a mianowicie białko to pozwala nie tylko bakteriom patogennym na przystosowanie się do warunków panujących wewnątrz komórek gospodarza, ale przede wszystkim odpowiada również za wystąpienie pierwszych objawów klinicznych choroby.

Powiązanie specyficznej roli tego białka podczas infekcji z poznaniem i scharakteryzowaniem wybranych właściwości białka ClpB stało się głównym celem niniejszej pracy doktorskiej.

Doktorantka szczegółowo tym tematem zajęła się w kolejnej publikacji zatytułowanej: „*Immunoreactivity of the AAA+chaperone ClpB from Leptospira interrogans with sera from Leptospira-infected animals*”,

ul. Czysła 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

w której przeprowadziła analizę porównawczą sekwencji aminokwasowych białek ClpB *L.interrogans* w stosunku do sekwencji białka ClpB zawartego w modelowej bakterii *E.coli*. Na podstawie tej analizy autorka wykazała wysoki stopień wzajemnego pokrewieństwa obu białek, co może świadczyć o obecności w ich sekwencji stałych, zachowanych ewolucyjnie motywów. W kolejnym etapie doktorantka zaprojektowała plazmid, który zapewnił wydajną produkcję białka ClpB *L.interrogans* w systemie bakteryjnym *E.coli*. Dzięki temu doktorantka uzyskała czystą formę białka ClpB_{Li} i przystąpiła do zbadania immunoreaktywności tego białka z surowicami pochodzącymi od bydła i królików eksperymentalnie zakażonych wybranym szczepem *Leptospira spp.* Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wyciągnęła bardzo ważne wnioski, a mianowicie stwierdziła że białko ClpB Li jest immunoreaktywne, czyli indukuje odpowiedź humoralną o czym świadczy podwyższony poziom przeciwciał anti- ClpB_{Li} klasy IgG w surowicach zakażonych zwierząt. Ponadto wykorzystując specyficzne przeciwciała anti- ClpB_{Li} doktorantka zidentyfikowała to białko również w nerce chomików zakażonych *L.interrogans*. Jak słusznie zauważyła może to świadczyć o produkcji tego białka nie tylko na etapie początkowej kolonizacji, ale również w trakcie rozprzestrzeniania się krętków w ustroju zakażonych zwierząt.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Wyniki uzyskane na tym etapie przygotowania rozprawy doktorskiej były bardzo interesujące i rzucały nowe światło na zagadnienia wirulencji krętków *Leptospira* dlatego zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie BMC Microbiology (5-letni IF=2.99).

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Na kolejnym etapie pracy, doktorantka skupiła się na szeregu badaniach podstawowych, których celem było między innymi analiza struktury II rzędowej oraz stabilności termicznej białka ClpB_{LI}, ponadto doktorantka zaobserwowała, że obecność nukleotydów: ATP, AMP-PNP, ADP w różnym stopniu chroniła białka ClpB_{LI} i ClpB_{EC} przed proteolitycznym działaniem trypsyny i co najważniejsze proces trawienia postępował bardzo szybko bez obecności wymienionych powyżej nukleotydów, co świadczy o silnej stabilizacji tych białek pod wpływem nukleotydów.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Jak słusznie zauważyła doktorantka, oporność ClpB_{LI} na działanie trypsyny w obecności różnych nukleotydów pokrywa się ze zdolnością tego białka do tworzenia form oligomerycznych. Kolejnym zadaniem było oznaczenie podstawowej aktywności ATPazowej białka ClpB_{LI} w porównaniu do białka ClpB_{EC}.

Na szczególną uwagę zasługują badania w których doktorantka skupiła się nad poszukiwaniem odpowiedzi na pytanie , czy białko ClpB_{LI} jest w stanie funkcjonalnie zastąpić ClpB_{EC}? W tym celu sklonowano gen ClpB_{LI} w niskokopijnym wektorze pGB2, zrekombinowany plazmid wprowadzono do komórek mutantu *E.coli* i przeanalizowano ich wzrost bakterii w temp. 45 °C i 50 °C. Badania te pozwoliły na wyciągnięcie bardzo ciekawego wniosku, a mianowicie, że białko ClpB_{LI} nie jest w stanie funkcjonalnie zastąpić białko ClpB_{EC} prawdopodobnie ze względu

ul. Czysła 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

na brak współpracy z systemem chaperonowym KJE z *E.coli*, co może wskazywać na dużą specyficzność gatunkową białek opiekuńczych.

Powyższe wyniki udało się doktorantce opublikować w jednym z bardziej renomowanych czasopism, a mianowicie w PLoSOne (IF= 3.394).

Wydział Lekarski

Ostatnim etapem pracy doktorskiej było wstępna identyfikacja potencjalnych, fizjologicznych substratów białka ClpB_{Li} z lizatów leptospir traktowanych czynnikami stresowymi. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka zidentyfikowała aż 68 potencjalnych białek tworzących kompleksy z ClpB_{Li}. Jak stwierdziła, większość z tych białek pełni kluczowe role w głównych szlakach metabolicznych komórki bakteryjnej (takich jak: cykl Krebsa, glikoliza, biosynteza aminokwasów, metabolizm kwasów tłuszczowych). Dlatego doktorantka podsumowała to stwierdzeniem, że rola białka ClpB_{Li} w wirulencji leptospir polega na ochronie aktywności tych enzymów oraz kontrolowaniu metabolizmu *Leptospira* w warunkach stresowych. Wyniki uzyskane z tej części badań zostały opublikowane przez doktorantkę w Int. J.Mol.Sci (IF=3.482).

Katedra Mikrobiologii

W podsumowaniu swojej pracy doktorskiej autorka zwraca uwagę na najważniejsze aspekty swojego opracowania, a mianowicie podkreśla znaczenie białka ClpB_{Li} w indukowaniu humoralnej odpowiedzi komórkowej, ponadto autorka podkreśla, że białko to jest syntetyzowane podczas infekcji i tworzy heksameryczne struktury

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

stabilizowane w obecności nukleotydów oraz oddziałuje z agregatami białkowymi w stanie związania z ATP.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Należy mieć nadzieję, że tak staranne poznanie właściwości białka opiekuńczego ClpB *Leptospira* pozwoli w przyszłości na opracowanie skutecznych metod walki z tymi bakteriami włączając w to syntezę właściwych antybiotyków nowej generacji.

Wydział Lekarski

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest zbiorem 4 publikacji o łącznym IF= 10.996. Prace te poddane były szczegółowej ocenie recenzentów w poszczególnych czasopismach i sam fakt ich opublikowani może świadczyć o ich bardzo wysokim potencjale naukowym niosącym w sobie dużo elementów nowości.

Katedra Mikrobiologii

Doktorantka (wraz z zespołem kierowanym przez Panią dr hab. Sabinę Kędzierską-Mieszkowską, prof.UG) wykazała się doskonałą znajomością i opanowaniem warsztatu molekularnego z dziedziny nauk biologicznych.

Na uwagę zasługują rzetelność i dokładność zarówno w planowaniu jak i przeprowadzeniu badań podstawowych.

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Krajewskiej jest bardzo oryginalna, stojącą na wysokim poziomie naukowym, starannie przygotowana pod każdym względem o czym

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl




może świadczyć brak uwag recenzenta (po części wynika to z faktu, iż prace te były prawdopodobnie poprawiane po wcześniejszych uwagach recenzentów z poszczególnych czasopism).

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Stawiam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Krajewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie tej pracy ze względu na bardzo wysoką wartość naukową tego opracowania.

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii


Prof. dr hab. Magdalena Strus

Kraków 26.06.2018

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl