

**FACULTY OF BIOTECHNOLOGY****DEPARTMENT OF MOLECULAR MICROBIOLOGY**ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław | Poland

Tel. +48 71 375 25 02 | +48 71 375 26 40

Fax +48 71 375 76 61

www.biotech.uni.wroc.pl | www.ibmb.uni.wroc.pl/zmm

W04 10.04.17

M. Podhorska-Okolow
WYDZIAŁ LEKARSKI
Prodziekan ds. Nauki

prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Wrocław, 04.04.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej**mgr Barbary Pawłowskiej****pt. „Wpływ cytokin prozapalnych na cytotoksyczność amyloidu *Escherichia coli* dla komórek nabłonka jelit“**

Białka amyloidowe kojarzą nam się głównie z różnymi chorobami w tym neurodegeneracyjnymi. Jednakże amyloidy pełnią również ważne biologiczne role. Przykładowo, u wielu Gram-ujemnych bakterii, spiralne fimbrie zbudowane są z białek amyloidowych. Spiralne fimbrie są najlepiej poznane na przykładzie *Escherichia coli*, gdzie podobnie jak u innych bakterii odpowiedzialne są za tworzenie biofilmu oraz przyleganie do komórek gospodarza. Poznanie roli amyloidowych fimbrii w procesie adhezji chorobotwórczych szczepów *E. coli* do komórek gospodarza wydaje się istotne zwłaszcza w aspekcie mechanizmów patogenezы tej bakterii. Ponadto badania nad funkcjonalnymi (dla bakterii oczywiście!) amyloidami mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia natury patogennych amyloidów występujących u człowieka.

W tym świetle podjęte przez Doktorantkę badania zmierzające do poznania wpływu białek amyloidowych fimbrii spiralnych na zmieniony zapalnie nabłonek jelita wydają się uzasadnione.

Oceniana rozprawa ma tradycyjny układ z podziałem na: Wstęp, Cel, Materiały i Metody, Wyniki i Omówienie oraz Dyskusję. Rozprawę kończą wnioski i streszczenie w języku polskim i angielskim.

„Wstęp” składa się z trzech podrozdziałów. W pierwszym scharakteryzowano chorobotwórcze szczepy *E. coli*. W drugim, najobszerniejszym podrozdziale opisano białka amyloidowe, ich strukturę, wstępowanie i funkcje jakie pełnią. W tej części najwięcej miejsca, co jest logiczne, poświęcono amyloidowym fimbriom spiralnym. Do fragmentu opisującego biogenezę fimbrii spiralnych z tego podrozdziału mam dwie uwagi: (i) nie ma informacji o tym, że białko CsgA na N-końcu ma sygnałową sekwencję kierującą, co jest

wyników, a rozdział ten powinien być napisany w sposób syntetyczny. Zdaje sobie sprawę z tego, że trudno jest dyskutować na temat sprzecznych wyników, jeżeli analizujemy dane w układzie o dużym stopniu złożoności. Myślę w związku z tym, że podzielenie „Dyskusji” na kilka podrozdziałów, z których każdy mógłby być zatytułowany w formie wniosku, znacząco uporządkowałoby ten rozdział a w konsekwencji ułatwiłoby jego czytanie.

Uwagi:

1. Niekompletne podpisy rycin. Uniemożliwia to zrozumienie rycin zwłaszcza tych zawartych w rozdziale „Wyniki i Omówienie“ (np. ryc. 13). Często w rycinach zaczerpniętych z innych artykułów brakuje pełnych opisów i symboli (np. ryc. 2).
2. Str. 15, błędnie podano długości genów *csgA* i *csgD* oraz masy cząsteczkowe białek CsgA i CsgB i liczby reszt aminokwasowych wchodzących w skład tych białek; str. 33, 295 pz, to nie cały gen *csgA* lecz jego fragment.
3. Nie przedstawiono dokumentacji z izolacji białek amyloidowych fimbrii spiralnych, a przede wszystkim nie podano stopnia oczyszczenia białek amyloidowych fimbrii spiralnych. Jest to istotne, ponieważ preparatów tych użyto do dalszych badań, w tym do immunizacji królików. Ponadto Doktorantka powinna zbadać czystość preparatów pod kątem obecności LPS. Na rycinie 29 przedstawiającej oczyszczone białka fimbrii spiralnych nie podano ile białka naniesiono na żel. Nie wiadomo również, czy w preparacie oprócz CsgA było obecne również białko CsgB. W celu izolacji białka CsgA można zastosować nowsze metody np. izolacja rekombinowego białka CsgA w fuzji z His₆ (J Biol Chem. 2008 283(31): 21530–21539; Methods Mol Biol. 2013; 966: 53–75).
4. Analiza mutantów delecyjnych powinna być schematycznie przedstawiona (mapa genetyczna z zaznaczonymi starterami używanymi do PCR). Zwykle mutanty delecyjne sprawdza się nie tylko za pomocą PCR, ale również za pomocą analizy *Southern blotting*. Brak jest również informacji dotyczących plazmidów (pKD4, pKD78) użytych do konstrukcji mutantów delecyjnych.
5. Ryc. 2, i podrozdział 3.2.9., jeżeli stężenie barwnika fluorescencyjnego podaje się w μM to stężenie białka CsgA powinno być również podane w μM (a nie w mg/ml). Proszę porównać uzyskane wyniki z wynikami prezentowanymi w pracy Wang'a i wsp. (J Biol

w art. 13 ust. 1 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. 595, z późn. zm.). Doktorantka wykonała szereg wartościowych doświadczeń używając wielu zróżnicowanych metod. Mam nadzieję, że Doktorantka opracowując wyniki (zawarte w tym doktoracie) do publikacji uwzględni zawarte w recenzji uwagi. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich o dopuszczenie mgr Barbary Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska