



UNIWERSYTET WARSZAWSKI WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+22) 55-41-304, FAX: (+22) 55-41-304

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 15. 06. 2018.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR JOANNY KRAJEWSKIEJ

„Charakterystyka białka opiekuńczego ClpB (Hsp100) pochodzącego z patogennej bakterii *Leptospira interrogans*, etiologicznego czynnika leptospirozy”

Rozprawa doktorska Pani Joanny Krajewskiej została wykonana w laboratoriach Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej pod kierunkiem Pani dr hab. Sabiny Kędzierskiej-Mieszkowskiej oraz Pana dr. n. wet. Zbigniewa Arenta w roli promotora pomocniczego. Praca mocno wpisuje się w nurt badań realizowanych ostatnio w Katedrze przez zespół badawczy z Pracowni Biochemii Mikroorganizmów, związanych także z badaniami dotyczącymi znaczenia biologicznego bakteryjnych białek opiekuńczych. Program badań zaplanowanych do realizacji w ramach pracy doktorskiej został sprowadzony do charakterystyki molekularnej białka opiekuńczego ClpB, które należy do rodziny białek szoku termicznego i jest znane w literaturze z możliwości współpracy z innymi białkami opiekuńczymi tworząc wspólnie system bi-chaperonowy. Już na początku należy zaznaczyć, iż oceniana rozprawa zawiera wielki potencjał poznawczy ze względu na duże znaczenie badanego białka w procesach życiowych wielu bakterii, w tym groźnych dla człowieka patogenów. Podjęty problem badawczy jest aktualny i niezwykle atrakcyjny pod względem naukowym, tym bardziej, że dotychczasowe informacje naukowe dotyczące mechanizmów działania białek opiekuńczych w procesach patogenezy nie są wciąż wyjaśnione. Podjęcie się zadania wyjaśnienia roli białka ClpB w procesie patogenezy *Leptospira interrogans* było wyzwaniem ryzykownym, ale za to atrakcyjnym pod względem naukowym. Zrealizowana praca doktorska została skonstruowana zgodnie z zasadami i w mojej ocenie tak właśnie powinny wyglądać współczesne rozprawy doktorskie. W obszernym streszczeniu pracy Doktorantka zawarła przegląd zawierający wszystkie najnowsze dane na temat bakteryjnego białka opiekuńczego ClpB w oparciu o najnowsze doniesienia światowe na ten temat. Jednak badania prowadzone dotychczas przez liczne zespoły naukowe nie wiązały specyficznej roli tego białka z procesem patogenezy prowadzonej przez *Leptospira*. Jak słusznie założono w

pracy, opisywane białko przez cały szereg swych właściwości jest powiązane z procesami infekcji, m. in. poprzez zaangażowanie w procesy dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych. Przeprowadzona charakterystyka strukturalna i biochemiczna białka ClpB, a także przeprowadzone liczne analizy proteomiczne pozwalają na zrozumienie roli tego białka w patogenezie leptospirozy. Jest oczywiste, że tego typu badania mają znaczenie poznawcze, ale biorąc pod uwagę udział białek opiekuńczych w patogenezie, należy zauważyć także aspekt aplikacyjny tej rozprawy ze względu na ewentualnie planowane skutecznie terapie antybakteryjne wynikające ze znajomości mechanizmów molekularnych związanych z wirulencją groźnych patogenów bakteryjnych. W dalszej części rozprawy przedstawiono 4 publikacje oryginalne dotyczące charakterystyki białka ClpB. Wszystkie te prace oryginalne zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, takich jak: *Adv. in Biosc. and Biotech.*, *BMC Microbiology*, *PLOS One*, *Int. J. Mol. Sci.* i wszystkie związane są z charakterystyką właściwości białka ClpB z *Leptospira interrogans*. Badania wstępne dotyczyły analizy porównawczej białka ClpB_{Li} ze dobrze poznanym białkiem ClpB z *Escherichia coli*. Kolejna publikacja dotyczyła produkcji ClpB_{Li} w systemie bakteryjnym *E. coli*, a następnie dwuetapowego oczyszczania i zbadania jego właściwości immunoreaktywności w wyniku reakcji z surowicami zwierząt zakażonych zwierząt. Dużym i ważnym osiągnięciem naukowym w tym momencie było udowodnienie, że badane białko indukuje odpowiedź immunologiczną oraz jest obecne podczas infekcji tkanek i narządów gospodarza, co może wskazywać na jego udział w wirulencji. W kolejnej pracy określono precyzyjnie strukturę białka i potwierdzono jego stabilność termiczną. Ponadto wykazano, że ClpB_{Li} jest stosunkowo odporne na działanie trypsyny w obecności nukleotydów, co pozwoliło na wyciągnięcie uprawnionego wniosku, iż proces oligomeryzacji białka w obecności nukleotydu jest podstawą dla procesu dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych, istotnej funkcji tego białka. Dodatkowo wykazano niezależność aktywności ClpB_{Li} od systemu nadrzędnego białek KJE. Ostatnie badania wchodzące w skład rozprawy dotyczyły wyznaczenia najistotniejszych substratów dla ClpB_{Li} i okazało się, że są nimi przede wszystkim kluczowe enzymy metaboliczne. Jednak końcowy wniosek, iż rola białka ClpB_{Li} w wirulencji tych bakterii polega na funkcji ochrony aktywności tych enzymów oraz w kontroli metabolizmu w warunkach stresowych wymaga jeszcze badań i obecnie jest dyskutowany. Niewątpliwie jednak jest to, iż wyniki uzyskane w przedstawionych pracach oryginalnych, a tym samym w ocenianej rozprawie doktorskiej, przyczyniają się do poszerzenia naszej wiedzy na temat udziału białek opiekuńczych w procesach patogenezy. Nie ulega wątpliwości, że ciekawe spostrzeżenia doktorantki mają wielkie znaczenie

aplikacyjne, bo mogą w przyszłości pozwolić na podjęcie strategicznej decyzji o nowych rozwiązaniach w zakresie walki z groźnymi patogenami człowieka. Wyniki jednoznacznie wskazują na fakt, iż prezentowana rozprawa doktorska przybliży pełne zrozumienie udziału białek opiekuńczych w procesie patogenezы. Odkrycie naukowe doktorantki opisujące niezależną od KJE aktywność dezagregazy pozwala na przypuszczenie, iż miało to miejsce na skutek adaptacji do wewnątrzkomórkowego cyklu życiowego *Leptosira*. Potencjał aplikacyjny pracy został mocno podkreślony, a przedstawione publikacje zapewniają o wysokim poziomie naukowym rozprawy. Odrębnym elementem pracy doktorskiej są oświadczenia współautorów publikacji, wśród których w każdym przypadku Pani mgr Anna Łukasik jest głównym i pierwszym autorem. Jej udział we wszystkich pracach polegał na wykonaniu większości doświadczeń opisywanych w publikacjach, a także ich wspólnym planowaniu doświadczeń oraz przygotowaniu manuskryptów. Szczegółowa analiza eksperymentów realizowanych przez doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej widzianych w perspektywie przedstawionych prac oryginalnych pozwala z całą pewnością na stwierdzenie, iż rzeczywiście jest ona głównym wykonawcą przedstawionych publikacji, a publikacje te mogą tworzyć cykl prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Zaprojektowanie i uzyskanie kolejnych wyników oraz ich pełna interpretacja wymagała od doktorantki dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba przeprowadzonych analiz i liczba wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej znacznie wykracza poza przeciętną.

Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Krajewskiej daje podstawę do dalszej pracy nad badaniem mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością białek opiekuńczych, szczególnie podczas procesu patogenezы. Jednak, aby z całą pewnością można było uznać wnioski Doktorantki za w pełni uprawnione, konieczne byłoby poparcie niektórych danych innymi dowodami bezpośrednimi na drodze eksperymentalnej. Przypuszczenie, że ClpB_{Li} izolowane z bakterii patogennej uległo zmianie na skutek innego trybu życia wymaga silniejszej dokumentacji. Również istotnym może być wpływ białek opiekuńczych na szereg innych czynników patogenezы, do których z pewnością nie zalicza się enzymów metabolicznych. Doktorantka nie rozważa o perspektywach dalszych badań tego typu będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy, nie dyskutuje także o ewentualnych kolejnych eksperymentach prowadzących do możliwości opanowania problemu pewnych chorób, gdzie białka opiekuńcze mogły by stać się celem rażenia. Ze względu na to, że ramach obecnej formy rozpraw doktorskich nie ma miejsca na tego typu rozważania, chciałbym dowiedzieć się, jak wyobraża sobie doktorantka pracę w tym kierunku i jak

wygląda perspektywa tego typu programu badawczego. Chciałbym poznać opinię Doktorantki na ten temat podczas obrony pracy. W podsumowaniu pragnę podkreślić, iż przedstawiona do oceny rozprawa zawiera nowatorskie wyniki na temat roli białek opiekuńczych w wirulencji generowanej przez bakterie patogenne. Opisane przez doktorantkę badania naukowe reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i istotne treści do ogólnej wiedzy na temat charakterystyki białek opiekuńczych.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Krajewskiej spełnia wymagania stawiane współczesnym pracom doktorskim i wnoszą do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy opublikowanych prac i ogrom pracy wniesiony przez doktorantkę w tę pracę doktorską, wnioskuję o stosowne wyróżnienie tej wartościowej i dobrze opublikowanej rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

prof. dr hab. Jacek Bielecki