

prof. dr hab. Michał Obuchowski  
Zakład Bakteriologii Molekularnej  
Dębinki 1  
80-211 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Beaty Bieleckiej zatytułowana  
„Wewnątrzkomórkowe funkcja białka HtrA u bakterii *Helicobacter pylori*”

Rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Bieleckiej jest oryginalnym opracowaniem liczącym 185 stron maszynopisu oraz nośnikiem cyfrowym zawierającym surowe dane doświadczalne. Podział pracy jest prawidłowy, w klasycznym układzie rozdziałów. Tematem pracy jest funkcja białka HtrA w utrzymaniu dobrostanu proteomu komórek *Helicobacter pylori*. Białka, rozumiane jako ciągi reszt aminokwasowych, są uniwersalnym budulcem komórkowym. Dzięki różnorodności chemicznej łańcuchów bocznych aminokwasów wchodzących w skład białek mogą one pełnić praktycznie wszystkie funkcje niezbędne w żywej komórce. Ta uniwersalność ma jednak pewną cenę. Powstające polipeptydy często potrzebują pomocy, aby osiągnąć prawidłowe ułożenie przestrzenne, które będzie niezbędne dla ich biologicznej funkcji. Dodatkowo, uformowane już białka są wrażliwe na zmiany fizykochemiczne zachodzące w ich otoczeniu, które mogą prowadzić do zaburzenia ich prawidłowego kształtu a co za tym idzie, ich funkcji. Wymienione w tytule rozprawy białko, HtrA, należy do grupy enzymów komórkowych stających na straży dobrostanu proteomu komórki i jest zaangażowane w usuwanie nieodwracalnie uszkodzonych białek. O istotności pełnionej funkcji świadczy fakt, że gen kodujący wyżej wymienione białko można uznać za niezbędny do przeżycia komórki, z jednym opisanym w literaturze wyjątkiem (szczep *H. pylori* N6).

Ponieważ wszystkie opisane, komórkowe formy życia w dużej mierze zależą od dobrostanu ich proteomu badania przeprowadzone przez Doktorantkę dotyczą jednego z niezmiernie istotnych układów odpowiadającego za usuwanie z komórki „popsutych” białek. Wyniki uzyskane w stosunkowo prostym modelu bakteryjnym są łatwe do wykorzystania podczas badania bardziej złożonych układów, na przykład, organizmów wielokomórkowych.

### **Wstęp**

Rozdział ten, liczący 27 stron jest poprzedzony spisem stosowanych skrótów. Jest to gradka dla recenzenta, ponieważ prawie zawsze można coś tam znaleźć. W rozprawie Pani Bieleckiej, rzuca się w oczy skrót BHI, którego rozwinięcie jest podane błędnie w j. angielskim i w ogóle brakuje tłumaczenia na j. polski. Dalsza lektura tego rozdziału wprowadza czytelnika w zagadnienia związane bezpośrednio z tematem rozprawy, czyli utrzymaniem prawidłowego stanu proteomu komórki we wszystkich jej przestrzeniach (tj. cytoplazmie i przestrzeni periplazmatycznej). Autorka wskazuje na różnice w sposobie działania tych systemów u różnych gatunków bakterii. Rozdział jest napisany jasnym i zrozumiałym językiem. Chciałbym zwrócić uwagę na niektóre pewne, nie do końca ściśle sformułowania: i) na str. 18 wspomina Pani o „systemie DnaK” – lepiej byłoby wspomnieć o systemie białek Hsp70 do których należy DnaK; ii) jeśli białko jest „niezwinęte” (str. 21) to raczej trudno mówić o jego strukturze; iii) charakterystyczne elementy sekwencji I-szo rządowej białek są zbudowane z reszt aminokwasowych a nie aminokwasów (str. 31).

### **Materiały i Metody**

Pani Bielecka zdecydowała się na utworzenie dwóch osobnych rozdziałów dla materiałów oraz metod. Pomimo tego pozwolę sobie omówić te dwa rozdziały łącznie. Pierwszym wrażeniem jest duża szczegółowość obu omawianych rozdziałów, co stwierdzam z dużym zadowoleniem. Zauważam bardzo dużą staranność w redakcji tych rozdziałów, gdzie ze względu na konieczność stosowania wzorów chemicznych bardzo łatwo o błędy pisarskie. W tym konkretnym przypadku 99,99% zapisów jest prawidłowy. Udało mi się znaleźć tylko jeden mały błąd – gratuluję precyzji zapisu. Równie skrupulatnie zostały opisane procedury doświadczalne stosowane podczas prowadzonych badań. Miałbym tylko pytanie dotyczące tabeli 20 (str. 81). Jakie faktyczne stężenie buforu AP zastosowano w przypadku „kontrolni HtrA” oraz „kontrolni substratu”. Czy w przypadku „badanej próby” było ono takie samo jak stosowanie wcześniej? Jeśli nie, chciałbym usłyszeć dla czego.

## Wyniki

Rozdział ten ma objętość 72 stron i zawiera opis uzyskanych wyników przez Panią mgr. Bielecką. Lektura pozwala na odbycie wspólnej „wyprawy” do wnętrza komórki *H. pylori* w celu poszukiwania substratów oraz partnerów białka HtrA. Autorka rozpoczyna swoją drogę od stosunkowo prostych metod dostosowując swój warsztat do uzyskiwanych wyników oraz potrzeb. Układ treści odzwierciedla postępy i trudności w prowadzonych badaniach. Ponieważ treść tego rozdziału przedstawia granice naszej wiedzy mam kilka uwag i pytań: i) Na rysunku 10 przedstawiono oczyszczanie białka HtrA z metką histydynową. Poproszę o dwa-trzy słowa komentarza dotyczącego rysunku 10B, ponieważ mam wątpliwość co do masy wskazanego prążka w żelu SDS-PAGE. Patrząc na wzorec, uzyskany prążek migruje między 3 a 4 prążkiem wzorca (patrząc od góry żelu) a więc raczej nie posiada masy 50kDa.

Chciałbym prosić o poszerzone uzasadnienie wyboru do dalszych badań proteaz HP\_0657, 1012 oraz 1350. Białko HtrA ma aktywność proteolityczną, w związku z tym, dlaczego założono, że kolejne proteazy periplazmatyczne miałyby oddziaływać z badanym białkiem?

Kolejne pytanie będzie dość szerokie: jeśli delecję genu kodującego badane białko zdołano uzyskać tylko w szczepie N6 czy porównano w całości sekwencję genomów szczepów N6 i 26695? Dlaczego do amplifikacji wykorzystano jako źródło materiału genetycznego szczep 26695 pomimo stwierdzenia różnic za pomocą analizy BLAST (str. 110)? Jeśli szczep N6 jest jedynym w którym udało się wprowadzić delecję genu *htrA*, może te drobne różnice są istotne? Interesującą kwestią wydaje się również efekt dodania specyficznego inhibitora proteazy HtrA, HHI. Czy wykonano lub planowano wykonanie testów aktywności inhibitora HHI na pozostałe badane proteazy (tj. HP\_0657, 1012 oraz 1350)? Zgadzam się z interpretacją Autorki dotyczącej zahamowania wzrostu szczepu N6  $\Delta htrA$ , jednak ciekaw jestem jego wpływu na inne badane proteazy.

Ostatnia uwaga ma charakter raczej techniczny. Na rys. 38 przedstawiono wpływ SDS na ilość tworzonych kolonii. Niestety jakość zdjęć nie pozwala na ich zaobserwowanie, w związku z czym wierzę „na słowo” w interpretację Autorki.

## Dyskusja

Na kolejnych 13 stronach maszynopisu Doktorantka konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi dostępnymi w literaturze przedmiotu. Ponieważ uzyskane wyniki nie dają możliwości aby jednoznacznie przedstawić listę substratów oraz partnerów białka HtrA, Autorka skupiła się na wskazaniu możliwych oddziaływań i funkcji niezbędnych zarówno do utrzymania

funkcjonalności zewnętrznej błony komórkowej bakterii *Helicobacter pylori*, syntezę peptydoglikanu czy ekspresję i eksport czynników wirulencji. Uzyskany obraz wskazuje bardzo na złożoną funkcję białka HtrA w fizjologii komórki, która nie ogranicza się tylko do utrzymania dobrostanu proteomu ale sięga również integralności zewnętrznej błony komórkowej czy też peptydoglikanu.

### Literatura

Spis literatury jest imponujący i liczy aż 289 pozycji. Stanowi to bardzo szeroką podstawę złożoną z dostępnych informacji do planowania, przeprowadzania i interpretacji prac badawczych. Podejrzewam, że z powodu rozmiaru tego rozdziału Autorka wykorzystała jakiś program ułatwiający zarządzanie cytowaną literaturą. Jednak, charakterystycznym „skutkiem” wykorzystania takiego oprogramowania jest utrata stylu kursywy jaką zwyczajowo piszemy nazwy rodzajowe i gatunkowe, lecz jest to stosunkowo drobny mankament.

Przedstawiona praca wnosi oryginalny wkład naukowy w wiedzę o procesach zachodzących w komórkach żywych mających na celu koordynację procesu formowania i funkcjonowania makrostruktur. Są to fundamentalne procesy życiowe a poznanie ich mechanizmu może w przyszłości zaowocować nawet nowymi metodami leczenia skierowanymi na hamowanie etapów ich biogenezy. Droga do tego jest pewnie jeszcze daleka, ale badania podstawowe są niezbędnym kamieniem węgielnym, aby to mogło stać się prawdą w przyszłości. Doktorantka wykazała się dużym kunsztem eksperymentatora planującego, przeprowadzającego oraz wyciągającego wnioski z uzyskanych wyników. Zakres metod stosowanych w pracy jest imponujący, co wskazuje na duże umiejętności mgr. Bieleckiej jako eksperymentatora.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Beaty Bieleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*M. Obedrowski*