



dr hab. Grzegorz Dubin, prof. UJ
ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków

Telefon: (+48) 664-143-130
e-mail: grzegorz.dubin@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Zarzeckiej „Charakterystyka homologów HtrA bakteryjnych patogenów człowieka, *Helicobacter pylori* i *Stenotrophomonas maltophilia*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje badania biochemiczne, enzymologiczne i funkcjonalne bakteryjnych białek HtrA (ang. High Temperature Requirement A) pochodzących z dwóch gatunków bakterii patogennych dla człowieka, *H. pylori* i *S. maltophilia*.

Praca została przygotowana w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora, dr hab. Joanny Skórko-Głonek, prof. UG. Istotne elementy pracy zrealizowano ponadto w laboratorium prof. Steffena Backerta z Uniwersytetu Fryderyka i Aleksandra w Erlangen i Norymberdze oraz we współpracy z dr hab. Anną Zawilak-Pawlik z PAN we Wrocławiu. Przedstawione badania stanowią kontynuację tematyki analizowanej w grupie badawczej promotora rozprawy jeśli chodzi o zainteresowanie białkami HtrA. Są one jednocześnie ich twórczym rozwinięciem zarówno w zakresie badań nowych enzymów z tej rodziny, jak i zróżnicowanej metodologii stosowanej przez autorkę pracy.

Proteazy HtrA są szeroko rozpowszechnione wśród organizmów żywych od bakterii po człowieka. Ich główną funkcją jest usuwanie nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów. Posiadają też funkcję „białek opiekuńczych”, najprawdopodobniej starając się odtworzyć prawidłową strukturę napotkanych polipeptydów, które degradują jedynie wtedy, kiedy renaturacja okazuje się niemożliwa. Istotnym aspektem bakteryjnych proteaz HtrA jest ich rola w wirulencji. Już od dawna było wiadomo, że białka te pomagają mikroorganizmom przetrwać stres związany z infekcją organizmu gospodarza. Od niedawna jednak pojawiają się kolejne doniesienia, iż proteazy HtrA biorą bezpośredni udział w „ataku” na struktury obronne gospodarza w procesie infekcji. Jako takie, białka HtrA stanowią więc potencjalny cel molekularny przyszłych terapii. Właśnie ten kierunek prac – poznanie udziału białek HtrA w infekcji, stanowi dalekosiężny cel badań opisywanych w pracy. Przedstawione badania są kompleksowe i rozległe metodologicznie, od podstawowych analiz właściwości białek rekombinowanych, do kompleksowej charakterystyki mutantów delecyjnych.

Rozprawa została przygotowana w formie zbioru odbitek trzech publikacji naukowych autorki i współpracowników opatrzonych streszczeniem wprowadzającym bardzo pobieżnie w tematykę prac i prezentującym najważniejsze podejmowane zagadnienia. Tego fragmentu pracy dotyczy moja pierwsza uwaga. Forma rozprawy doktorskiej przedstawionej jako zbiór prac (która skądinąd bardzo mi się podoba) nie jest na chwilę obecną ugruntowana, w odróżnieniu od klasycznej formy rozprawy doktorskiej. W rozprawie zawierającej zbiór publikacji, osobiście preferowałbym krótkie streszczenie obejmujące maksymalnie jedną stronę (jak abstrakt publikacji naukowej) i zwięzły rozdział wprowadzający (10-15 stron), prezentujący wstęp do tematyki badań i syntetyczny opis prac i najważniejszych wyników, spinający w jedną całość tematyczną załączone publikacje naukowe. W niniejszej pracy znalazł się tekst pośredni, zbyt długi na streszczenie, a trochę zbyt krótki by przedstawić najważniejsze wyniki prac w spójnym i szerokim kontekście. Nie jest to zarzut istotnie wpływający na ocenę pracy. Wszelka niezbędna

informacja zawarta jest w załączonych publikacjach. We wstępie widziałbym jednak napisane lekkim piórem wprowadzenie pozwalające autorowi zaakcentować najważniejsze osiągnięcia i umiejscowić je w szerokim kontekście tematyki badań, co tutaj nie zostało w pełni zrealizowane.

Publikacje na których opiera się rozprawa obejmują dwie prace doświadczalne i jedną publikację przeglądową. Prace te ukazały się drukiem w ostatnich trzech latach w *Curr. Med. Chem.* (publikacja przeglądowa), *Int. J. Biol. Macromol.*, oraz *Front. Microbiol.* – czasopismach o ugruntowanej renomie w dziedzinie badań. Wiem także, iż w przygotowaniu jest kolejna praca o powiązanej tematyce, która jednak z uwagi na długi proces recenzji nie znalazła się w niniejszej rozprawie. Ponadto doktorantka jest współautorem jeszcze czterech prac o podobnej tematyce, które już wcześniej ukazały się drukiem. Doktorantka może więc pochwalić się doskonałym dorobkiem na tym etapie kariery naukowej (7 opublikowanych prac i przynajmniej jedna dodatkowa w recenzji).

Praca przeglądowa została włączona do opracowania jako pierwsza i zapewnia szeroki wstęp do tematyki badań. Wprawdzie stawia sobie ona na celu charakterystykę proteinaz HtrA jako potencjalnych celów terapeutycznych, nie zabrakło w niej jednak podstawowych informacji na temat omawianej rodziny enzymów. Informacja ta jest w dalszej części zawężana w kierunku tematu przewodniego – roli proteaz HtrA w wirulencji i ich potencjału jako celów molekularnych terapii lub szczepionek. Tym samym praca przeglądowa otwierająca rozprawę doktorską jest doskonałym wprowadzeniem do dalszych dwóch prac eksperymentalnych.

W pierwszej z publikacji eksperymentalnych przedstawiono charakterystykę biochemiczną homologa HtrA z *S. maltophilia*. Białko zostało otrzymane w heterologicznym systemie ekspresji i oczyszczone. Podobnie jak inne proteiny HtrA, preparat wykazuje aktywność względem zdenaturowanych, ale już nie natywnych białek. Podstawowe właściwości biochemiczne preparatu są w pracy porównane do preparatu HtrA z *E. coli*, białka modelowego dla tej rodziny. HtrA_{Sm} wykazuje także aktywność białka opiekuńczego. Wykazano ponadto zmiany stopnia oligomeryzacji w obecności substratu, podobne (ale nie identyczne) do tych obserwowanych w przypadku HtrA z *E. coli*. Specyficzność względem reszt aminokwasowych w obrębie hydrolizowanej sekwencji jest także podobna (choć nie identyczna) do tej obserwowanej dla HtrA z *E. coli* jednak istotność tego faktu pozostaje jedynie w sferze spekulacji. Wzmiankowane przeze mnie lakonicznie odkrycia, są w publikacji dokładnie opracowane pod względem porównawczym, opisowym oraz zilustrowane przejrzystymi rysunkami. Ogólna konkluzja pracy jest taka, iż białka HtrA z *S. maltophilia* i *E. coli* pełnią zapewne podobną rolę w obu organizmach (renaturacja / usuwanie zdenaturowanych białek), a różnice w ich właściwościach fizykochemicznych i aktywności wynikają najprawdopodobniej w przystosowań ewolucyjnych do innych nisz środowiskowych.

W drugiej publikacji eksperymentalnej autorka analizuje właściwości biochemiczne i enzymatyczne proteazy HtrA z *H. pylori*. W tym zakresie praca jest metodologicznie analogiczna do publikacji o HtrA z *S. maltophilia*. Białko zostało otrzymane w heterologicznym systemie ekspresji. Wykazano jego aktywność względem zdenaturowanych, ale nie natywnych substratów białkowych. Określono preferowane miejsca hydrolizy i przeanalizowano powstawanie form oligomerycznych. Wzmiankowane wyżej doświadczenia są bardzo przejrzysto opisane i przedyskutowane w publikacji. Wyniki ilustrowane są także dobrze przygotowanym materiałem graficznym. Poza charakterystyką biochemiczno-enzymatyczną, publikacja o HtrA z *H. pylori* dotyka ponadto aspektu funkcjonalnego tego białka. Jest to bardzo ciekawa część przedstawionej do recenzji rozprawy (i jak wynika z informacji podanych w streszczeniu, była to także część najtrudniejsza do realizacji), która zapewne nie powstałaby bez wcześniejszego zainteresowania

i charakterystyki podstawowych właściwości HtrA. Knockout białka HtrA był trudny do realizacji, zapewne z uwagi na kluczową funkcję tego białka. Udało się to tylko w jednym z ponad 100 testowanych szczepów. (Tutaj nasuwa się pytanie dlaczego? Czym charakteryzuje się ten konkretny szczep, że knockout HtrA nie jest letalny. Co więcej – nie posiada nawet wyraźnego fenotypu w nie stresowych warunkach. A jeśli tego nie wiadomo, to jak można by to zbadać?). Knockout wykazywał zmniejszoną przeżywalność w warunkach stresowych, szczególnie skutkujących nieprawidłowym fałdowaniem białek, co bezpośrednio potwierdza rolę HtrA_{Hp} jako białka procesującego/usuwającego nieprawidłowo sfałdowane białka. Powyższe wyniki są bardzo interesujące, gdyż HtrA_{Hp} jest czynnikiem wirulencji *H. pylori*. Proteaza ta odpowiada za degradację połączeń międzykomórkowych w organizmie ludzkiego gospodarza. Ukoronowaniem prezentowanych prac byłoby wykazanie roli HtrA_{Hp} podczas infekcji *in vivo* przy wykorzystaniu skonstruowanego mutantu delecyjnego. Czy istnieją do tego odpowiednie modele? Czy takie badania są planowane?

Podsumowując, autorka, wraz ze współpracownikami przedstawiła charakterystykę enzymologiczną i biochemiczną dwóch homologów HtrA z *S. maltophilia* i *H. pylori*. W przypadku tego drugiego enzymu, przedstawiła także wstęp do charakterystyki funkcjonalnej. Jako, że białko HtrA z *H. pylori* stanowi czynnik wirulencji tej bakterii przedstawione dane stanowią istotne odkrycie w temacie. Praca stanowi spójną całość, w której brakuje właściwie tylko eksperymentu *in vivo* pokazującego fenotyp skonstruowanego szczepu delecyjnego w modelu zwierzęcym. Z uwagi jednak na ograniczenie czasowe w realizacji doktoratu nie jest to bynajmniej zarzut, ale jedynie wskazanie (zresztą oczywistego) kierunku dalszych prac.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Urszuli Zarzeckiej spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny dorobek naukowy kandydatki uzasadnia zawiązanie nadanie jej stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę o dopuszczenie pani magister Urszuli Zarzeckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Grzegorz Dubin, prof. UJ
Kierownik Grupy Badawczej
Krystalografii Białek MCB UJ