



**INSTITUTE OF
BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS**
POLISH ACADEMY
OF SCIENCES

Warszawa, 29. 04. 2015.

Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Prof. dr hab. Wojciech Bal

Tel: +48-22-5922371 Fax: +48-22-6584636

e-mail: wbal@ibb.waw.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marcina Bieleckiego

Pan mgr Marcin Bielecki przedstawił do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „Charakterystyka białek kodowanych przez operon hmu z *Porphyromonas gingivalis* i innych bakterii”, wykonaną na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Olczak.

Część merytoryczna rozprawy, liczącej w sumie 111 stron, rozpoczyna się od streszczenia w językach polskim i angielskim, po których kolejno następują Cel pracy, Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia, spisy rysunków i tabel, a na końcu suplement, wyliczający publikacje Doktoranta, obejmujące materiał doktoratu, wraz z omówieniem jego w nich udziału. Rozprawa jest napisana zasadniczo dobrym, klarownym językiem, z nielicznymi usterkami, omówionymi w dalszej części recenzji. Jest ułożona w sposób przejrzysty i bardzo rzetelnie zilustrowana.

Streszczenie spełnia swoje zadanie, dając czytelnikowi sposobność do szybkiego zorientowania się w przedmiocie rozprawy.

W 20-stronicowym wstępie Autor omawia aktualny stan wiedzy na temat przyswajania żelaza i hemu przez bakterie, koncentrując się na badanych przez siebie organizmach *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Tannerella forsythia* w kontekście aktywności chorobotwórczej tych bakterii. Opis ten jest wyczerpujący, stanowiąc dobry punkt wyjścia dla przedstawienia wyników rozprawy. Na szczególną pochwałę zasługują dobrze dopracowane i bardzo klarowne schematy oddziaływań, wykonane własnoręcznie przez Autora. Nie mam uwag krytycznych do tej części, z wyjątkiem pewnych usterek językowych („konserwatywny” zamiast „konserwowany”, białko jest

„ekspresjonowane” zamiast „eksprymowane”, okazjonalne kalki składniowe z języka angielskiego, pojawiające się przy złożonych nazwach białek, w całej pracy występuje „oxyhemoglobina” przez x, zamiast ks).

Rzetelny i drobiazgowy opis metod badawczych, zastosowanych przy realizacji rozprawy, zajmuje 15 stron. Doktorant przedstawia w nim kolejno hodowlę bakterii, przygotowanie plazmidów do ekspresji badanych przez siebie białek, ich nadprodukcję, oczyszczanie i wstępną ocenę parametrów. Dalej opisana jest metodologia badań oddziaływań wariantów białka HmuY oraz białek PinA, PinO i Tfo z hemem za pomocą technik spektroskopowych, próby krystalizacji białek, badania współzawodnictwa badanych białek o hem związany do hemoglobiny i albuminy, a na koniec techniki bioinformatyczne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant skonstruował sześć nowych plazmidów ekspresyjnych, które zastosował z powodzeniem do otrzymania białek PinA, PinO i Tfo w dwóch wariantach – z etykietą sześciohistydynową i bez niej.

Pewnym mankamentem tej części rozprawy jest niepełne w moim odczuciu opisanie czystości otrzymywanych białek rekombinowanych. Otrzymane białka są chromatograficznie czyste, co w sposób jednoznaczny wykazano w opisie wyników badań na str. 56-58, niemniej uważam, że takie informacje powinny znaleźć się w ramach opisu metod badawczych. Uważam też, że białka te powinny zostać scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas. Autor przyjmuje, że sekwencje tych białek w pełni odpowiadają kodowi genetycznemu plazmidów. Jest to wysoce prawdopodobne w przypadku białek prokariotycznych, ale jednak warto byłoby to założenie zweryfikować.

Wyniki swoich doświadczeń mgr Marcin Bielecki przedstawia na 35 stronach rozprawy. Zasadnicza część wyników została uzyskana za pomocą technik spektroskopii elektronowej – UV-vis, CD i fluorescencji. Są one w przeważającej części opisane i zinterpretowane prawidłowo. Najciekawsze z nich dotyczą (w kolejności pojawiania się ich w tekście rozprawy) braku aktywności fluorescencyjnej reszty W161 w białku HmuY, wpływu podstawienia reszt Trp w tym białku na jego stabilność termiczną, zdolności białka HmuY do pobierania hemu od białek PinA i PinO oraz kluczowej różnicy między HmuY oraz PinA i PinO pod względem konkurencji o hem z hemoglobina. W ten sposób Doktorant jasno i jednoznacznie wykazał fundamentalne różnice zdolności tych białek do pobierania żelaza na potrzeby komórek odnośnych gospodarzy. Tak na marginesie, możliwą interpretacją utrudnienia redukcji Fe(III) w białkach PinA i PinO w pH 7.6 jest aksjalne oddziaływanie tego jonu z grupą hydroksylową.

Muszę odnieść się krytycznie do kilku innych aspektów części eksperymentalnej. Są to usterki o stosunkowo niewielkiej wadze dla całości rozprawy, niemniej ich omówienie należy do moich obowiązków recenzenta.

Opis wiązania jonów Ni(II) i Cu(II) do PPIX, przedstawiony na str. 48, wydaje się pozostawać w sprzeczności z udostępnionymi wynikami. Widma CD, przedstawione na Rys. 16 wskazują na wiązanie jonu Cu(II) do His134, a wyniki dla jonu Ni(II) wskazują na różne sposoby wiązania w badanych mutantach, ze wskazaniem na wiązanie raczej do His166. W opisie wiązania hemu do białek PinA, PinO i Tfo na str. 64 podane jest istnienie pasma przy 518 nm, którego nie widać na omawianych widmach (Rys. 29). Analiza krzywych miareczkowania, zawarta na str. 65-67 jest niezrozumiała. W Tabelach 6 i 7 Autor posługuje się parametrem V_{max} , który oczywiście dotyczy kinetyki reakcji, a nie izotermy wiązania. Parametr n (zapewne współczynnik Hilla) nie został zinterpretowany. Jest to dość istotne, gdyż jego wartość w większości przypadków jest bliższa 2 niż 1, co z kolei sugerowałoby dimeryzację miareczkowanych białek. Nie jest też jasne, w jaki sposób wyznaczano wartość nasycenia efektu spektroskopowego (100% przereagowania). Miareczkowania przedstawione na Rys. 31 zdecydowanie nie są doprowadzone do końca. Ponadto, krzywe miareczkowań fluorescencyjnych i absorpcyjnych dla poszczególnych białek znacznie różnią się od siebie, mimo zastosowania w eksperymentach takich samych stężeń białek. Ta kwestia nie została omówiona. Dyskusja widm CD, przedstawionych na Rys. 34 jest dość ogólnikowa. Nie została np. wspomniana jakościowa różnica między PinA i pozostałymi białkami. W białku PinA występuje dodatkowo pasmo w zakresie 230-240 nm, które może być generowane przez szczególną konformację reszt Trp. Wyjaśnienie tej kwestii mogą dać np. badania odpowiednich mutantów. Ciekawe eksperymenty, dotyczące reakcji badanych białek z oksyhemoglobina, mogły zostać precyzyjniej zinterpretowane, gdyby zastosowano wykresy zależności zmian widma od czasu i gdyby eksperymenty zostały powtórzone więcej niż jeden raz. Nota bene, w eksperymencie z białkiem Tfo, przedstawionym na Rys. 41, mamy ewidentnie do czynienia z wytrącaniem białka z roztworu.

Muszę również zwrócić uwagę na użycie nieprawidłowych określeń „koordynacja sferyczna, ligand sferyczny”. Prawidłowe są terminy „koordynacja oktaedryczna, ligand aksjalny”.

Dyskusja wyników zaczyna się od być może niepotrzebnego powtórzenia informacji, zawartych we wstępie, ale jej dalsza część jest zwarta i klarowna. Kluczowe wyniki rozprawy są przedstawione dobitnie i jednoznacznie. Doktorant w sposób nie budzący wątpliwości wykazuje wyjątkowość białka HmuY na tle pozostałych zbadanych przez siebie homologów.

Białko to jest zdolne do pobierania hemu od wszystkich badanych białek, zarówno bakteryjnych, jak i człowieka. Na podstawie tych rezultatów Doktorant rozwija ciekawą koncepcję współdziałania rozmaitych bakterii przyzębia w procesie infekcji na rzecz zwiększenia wirulencji *P. gingivalis*. Wynik ten pozwala na planowanie dalszych badań, ukierunkowanych na nowe metody leczenia infekcji przyzębia.

Znaczna część wyników została opublikowana w pięciu artykułach naukowych w dobrych czasopismach międzynarodowych, co potwierdza jakość i ważkość tych wyników. Pragnę w tym miejscu zaznaczyć, że skrytykowane przeze mnie powyżej aspekty analizy danych nie zostały zamieszczone w tych publikacjach.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedłożona do oceny praca p. mgr Marcina Bieleckiego spełnia wymogi ustawowe, stawiane przed rozprawami doktorskimi i wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

