



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Michała Śmigi

pt. „Udział białka PgFur w wirulencji bakterii *Porphyromonas gingivalis*”

Choroby przyzębia inicjowane przez bakterię *Porphyromonas gingivalis* coraz częściej wskazywane są jako jeden z czynników etiologicznych szeregu schorzeń systemowych, dotyczących zarówno chorób układu krążenia jak i reumatoidalnego zapalenia stawów, czy osteoporozy lub cukrzycy. Dlatego identyfikacja czynników wirulencji tej bakterii oraz mechanizmów ich wykorzystywania przez patogen w infekcjach tkanek gospodarza wydaje się być dobrą drogą zmierzającą do opracowania skutecznych leków lub terapii, zapobiegających nie tylko infekcjom lokalnym ale w również schorzeniom układowym. Praca doktorska przygotowana przez mgr Michała Śmigę, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Olczak, w Pracowni Biologii Medycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego doskonale wpisuje się w ten proces, poszerzając dotychczasowe osiągnięcia grupy prof. Teresy Olczak w tym zakresie.

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Praca doktorska mgr Michała Śmigi, zredagowana w języku polskim, została przygotowana według klarownego i zgodnego z aktualnymi wymogami układu. Liczy ona 144 strony, gdzie właściwy tekst rozprawy poprzedzony jest informacją na temat finansowania przeprowadzonych badań, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Rozdział wstępny rozprawy wprowadza czytelnika w tematykę schorzeń przyzębia, dentyfikując grupę patogenów bakteryjnych zasiedlających jamę ustną i zdolnych do kolonizacji dziąseł, przestrzeni międzyzębowych oraz kieszonki przyzębowej, dzięki formowaniu uorganizowanej struktury biofilmu, kreującego nowe środowisko dla działania bakterii. W dalszej części wstępu Doktorant przedstawia szczegółowo właściwości i działanie głównych czynników wirulencji *P. gingivalis*, a w szczególności: hemaglutynin i białek budujących fimbrie - odpowiedzialnych za adhezję patogenu, proteaz, a w szczególności gingipain – biorących udział w degradacji białek gospodarza istotnych dla procesów jego samoobrony i wreszcie, systemu pobierania hemu i żelaza, ułatwiającego bakteriom przeżywanie w organizmie gospodarza.

Zakład Biochemii
 Porównawczej i Bioanalitik
 ul. Gronostajowa 7
 30-387 Kraków
 tel. +48(12) 664 65 27
 fax +48(12) 664 69 02
 email: maria.rapala-
 kozik@uj.edu.pl

Mnogość czynników wykorzystywanych przez mikroorganizm w procesie infekcji wymaga precyzyjnego mechanizmu regulacji ich wirulencji. W swej pracy Doktorant zaprezentował szereg z nich, w szczególności systemy jedno i dwuskładnikowe, alternatywne czynniki sigma czy modyfikacje potranslacyjne, kładąc szczególny nacisk na ich znaczenie dla pobierania hemu i żelaza. Mechanizmy te przedstawione są klarownie a tekst opatrzony jest licznymi rycinami, co ułatwia jego zrozumienie. Następnie Doktorant skupia się na opisie białek należących do rodziny czynników transkrypcyjnych Fur, związanych z pobieraniem i homeostazą żelaza i innych metali dwuwartościowych, oraz na czynnikach transkrypcyjnych Crp/Fnr, należących do globalnych regulatorów transkrypcji. Stanowią one swego rodzaju czujnik mikrootoczenia, odpowiadający zarówno za formowanie biofilmu jak i generalnie za identyfikację warunków środowiskowych, w jakich bakteria musi się rozwijać, w tym dostępność składników odżywczych, faza wzrostu czy obecność czynników stresu oksydacyjnego.

Ta szeroka informacja pozwoliła Doktorantowi na nakreślenie celów swojej pracy, związanych z identyfikacją własności i mechanizmów działania wskazanych białek, a w szczególności: (1) określeniem roli białka PgFur w wirulencji wybranych szczepów *P. gingivalis*, różniących się genotypem oraz wskazaniem jego roli w oddziaływaniu, inwazji i przeżyciu bakterii wewnątrz komórek obronnych gospodarza, a także (2) wskazaniem analogicznych właściwości dla dwóch białek z rodziny Crp/Fnr, będących pod kontrolą białka PgFur.

Do realizacji zaplanowanych celów Doktorant wykorzystał całą gamę metod genetyki molekularnej, zmierzających do pozyskania szczepów *P. gingivalis* pozbawionych genów kodujących badane białka lub szczepów z odtworzoną ich obecnością. Doktorant przygotował także szczepy bakteryjne, umożliwiające nadprodukcję wskazanych białek w celu ich dalszego oczyszczania i analizy, a także przeprowadził produkcję odpowiednich mutein tych białek, dzięki którym mógł zweryfikować rolę poszczególnych aminokwasów, zlokalizowanych w centrach wiążących aktywnych białek. Tego rodzaju prace wymagają nie tylko bardzo dobrego przygotowania merytorycznego, ale także sprawności laboratoryjnej i cierpliwości w

przeprowadzaniu żmudnych, nie zawsze kończących się sukcesem działań genetycznych. Warto zatem szczególnie podkreślić wysoki poziom zaawansowania tych prac.

W badaniach dotyczących właściwości nadprodukowanych białek Doktorant zastosował szereg metod biochemicznych umożliwiających izolację i oczyszczanie tych białek oraz określenie ich zdolności do oddziaływania ze swoistymi ligandami. Wykorzystując szczepy pozbawione funkcjonalnych białek Doktorant zweryfikował ich rolę zarówno poprzez analizę wirulencji zmienionych bakterii jak i ich zdolności do formowania biofilmów międzygatunkowych czy interakcji z komórkami gospodarza, reprezentowanymi przez aktywowane komórki linii THP-1. Z kolei, stosując mikromacierze i q-PCR, Doktorant przeprowadził porównanie poziomu ekspresji wybranych genów, zarówno w szczepie dzikim jak i w mutantach pozbawionych możliwości wytwarzania wskazanego białka. Tak szerokie podejście do analizowanego problemu pozwoliło przedstawić szereg interesujących wyników i stosownego podsumowania w rozdziale dotyczącym dyskusji.

Rozdział rozprawy, poświęcony omówieniu uzyskanych wyników, rozpoczyna się od przedstawienia analiz przeprowadzonych *in silico* w odniesieniu do białka PgFur, w oparciu o jego sekwencję aminokwasową i porównań do rodziny białek Fur oraz białek biorących udział w koordynacji jonów metali, wraz z propozycją modelu przestrzennej struktury tego białka. Świadczy to o głęboko przemyślanych dalszych działaniach eksperymentalnych Doktoranta. W kolejnej części pracy Doktorant wyróżnił warunki hodowli bogate lub ubogie w hem i żelazo oraz inne jony metali dwuwartościowych, które decydowały o poziomie ekspresji genu *pgfur*. Porównując metodą mikromacierzy ekspresję genów w wybranych szczepach referencyjnych i szczepach pozbawionych produkcji PgFur, zaobserwował On możliwość udziału tego białka w regulacji ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny Crp/Fnr, w replikacji DNA a także w adaptacji bakterii do rozwoju w warunkach stresu oksydacyjnego. Badania te zostały wzbogacone o obserwacje dotyczące osłabionej możliwości formowania mieszanych biofilmów przez *P. gingivalis*, pozbawiony genu *pgfur*, wskazując

tym samym na możliwość jego udziału w rearanzacji składu błony zewnętrznej bakterii. Wykazano także, że białko PgFur może modulować ekspresję genów kodujących produkcję proteaz, w szczególności gingipain, wpływając tym samym na wirulencję bakterii. Jej poziom weryfikowano w kontakcie z komórkami THP-1, analizując zdolność do wnikania i replikację komórek bakteryjnych wewnątrz tych makrofagów.

Zaobserwowane właściwości funkcyjne białka PgFur Doktorant skorelował z jego strukturą, wyróżniając rolę fragmentu C-końca tego białka oraz jego centrum wiążącego jony metali, w szczególności jony cynku. Zidentyfikował On także fragment DNA operonu *hmu* rozpoznawany przez to białko.

Podobny proces analizy Doktorant zastosował w odniesieniu do białek z rodziny Crp i Fnr, przeprowadzając testy wirulencji, formowania biofilmów i interakcji z ludzkimi makrofagami. W wyniku tych badań, potwierdzony został udział tych białek w regulacji ekspresji genów związanych z produkcją niektórych czynników wirulencji, ale nie wykazano ich istotnego wpływu na oddziaływanie z komórkami THP-1.

W rozdziale "Wyniki" Recenzent nie zauważył błędów merytorycznych a uzyskane rezultaty przedstawione są w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Podkreślić tu należy, że mimo iż proces analityczny prowadzony dla białka PgFur został powtórzony dla białek rodziny Crp i Fnr, Doktorantowi udało się uniknąć możliwych powtórzeń a w prezentowanych wynikach zwracał On uwagę głównie na końcowe konkluzje.

Przeprowadzona drobiazgowa analiza wskazanych białek jest nie tylko istotna z punktu widzenia badań podstawowych ale, dotykając ważnego problemu wirulencji bakterii *P. gingivalis*, umożliwia wykorzystanie uzyskanych wyników w planowaniu przyszłych terapii antybakteryjnych i terapii, możliwych do aplikacji w leczeniu wskazanych schorzeń systemowych.

W rozdziale "Dyskusja" Doktorant drobiazgowo przeanalizował swoje wyniki pod kątem znaczenia badanych białek zarówno w utrzymaniu żywotności bakterii jak i konsekwencji ich eliminacji w kontakcie z komórkami gospodarza. Ponadto zwrócił On także uwagę na szerokie konsekwencje wprowadzanych mutacji, nie ograniczające się do głównych funkcji pełnionych

przez eliminowane białka, ale mogące również zmienić właściwości inwazyjne bakterii, w wyniku remodelingu błony komórkowej. Dyskusja zawiera także podsumowanie opatrzone schematem, unaoczniającym zidentyfikowane przez Doktoranta zależności.

Mimo drobiazgowej analizy roli tych białek wiele pytań pozostaje wciąż otwartych i wymaga dalszych prac, niemniej jednak Recenzent chciałby poznać opinię Doktoranta dotyczącą poniższych zagadnień oraz prosi o dodatkowe wyjaśnienia:

- 1) Proszę wyjaśnić dlaczego do modelowania struktury białka PgFur użyto model struktury jego homologu z bakterii *B. subtilis* a nie inny z homologów wykazanych w tabeli nr 5 na str. 67.
- 2) Formowanie wielogatunkowego biofilmu przez zmienione genetycznie szczepy *P. gingivalis* jest bardzo istotne dla zasiedlania tkanek gospodarza. Doktorant w przeprowadzonych analizach oddziaływań międzygatunkowych bakterii użył mało precyzyjnego testu koagregacji. Jakie inne, bardziej precyzyjne metody mogłyby wskazać Doktorant, które pozwoliłyby na precyzyjniejsze wnioskowanie o formowaniu mieszanych biofilmów?
- 3) Proszę o przedstawienie możliwego uzasadnienie preferencji szczepu A7436 do koagregacji z bakteriami *Tanerella forsythia* i *Prevotella intermedia* w porównaniu do *Streptococcus. gordonii* - bakterii, dla której w literaturze wskazano białka powierzchniowe *P. gingivalis*, zaangażowane we wzajemną interakcję tych mikroorganizmów.
- 4) W jaki sposób zmiana dystrybucji białka Hmu oraz wzrost aktywności proteolitycznej mutantów *P. gingivalis* mogłyby wpływać na formowanie mieszanych biofilmów z udziałem tego mikroorganizmu?

Praca doktorska została przygotowana w odniesieniu do 187 pozycji literaturowych dotyczących głównie doniesień prezentowanych w ostatnich latach, co wskazuje na rozpatrywanie problemu o bieżącym i globalnym zainteresowaniu środowiska mikrobiologicznego i biochemicznego. Warto podkreślić, że na liście tej pojawiają się także opublikowane prace własne Doktoranta, a Jego dorobek publikacyjny obejmuje pięć prac, które opublikowano w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. Możliwość

ich przygotowania wiązała się z udziałem Doktoranta w kilku projektach naukowych, w tym we własnym projekcie PRELUDIUM finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Ta informacja wprawdzie nie wpływa na ocenę pracy doktorskiej, ale umożliwia Recenzentowi podkreślenie dojrzałości naukowej jej Autora.

Rozprawa doktorska została także bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim; pojawiają się tylko pojedyncze błędy literowe, które zaznaczyłam w posiadanym egzemplarzu i informacje tę udostępnię Autorowi, bez drobiazgowego ich wyliczania w pisemnej opinii. Z obowiązku recenzenta wskazuję także drobne niedociągnięcia, które nie wpływają na ostateczną ocenę rozprawy. Mianowicie:

- 1) Nie znalazłam niestety w pracy objaśnienia dotyczącego znacznika HA jaki zawiera nadprodukowane białko PgFur – tab. 3, str. 45, oraz odnośnika literaturowego cytowanego w tekście a dotyczącego publikacji autorstwa Polaka z 2017 roku.
- 2) Autor omawia oczyszczanie białka z wykorzystaniem sita molekularnego. Termin ten, choć stosowany w biochemii, kojarzy się raczej z zastosowaniami technicznymi lub chemicznymi, może zgrabniej byłoby użyć opisu techniki chromatografii sączenia molekularnego lub filtracji żelowej, ze wskazaniem rodzaju użytego złoża.
- 3) Tłumaczenie wpływu utleniania reszt cysteiny białek PerR i PgFur, biorących udział w wiązaniu cynku „różnicą konformacyjną białka w trakcie rozdziału elektroforetycznego”, gdzie zastosowano elektroforezę denaturującą, wydaje się być pewną niezręcznością lub skrótem myślowym.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Śmigi spełnia całkowicie formalne i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami z dnia 30 października 2015 roku (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Co więcej, ogromna liczba uzyskanych przez Doktoranta wyników oraz ich ranga sprawiają, iż rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą się, mogącą służyć za wzór zarówno w aspekcie staranności językowej jak i wnikliwości naukowej, a świadczy o tym m.in. fakt opublikowania części wyników w renomowanych czasopismach biochemicznych. Wnioskuje zatem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Michała Śmigi stosowną nagrodą.



dr hab. Maria Rapała-Kozik, prof. UJ

