



ZAKŁAD BIOCHEMII ANALITYCZNEJ  
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII  
UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Andrzej Kozik

Kraków, dnia 28 kwietnia 2015 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej**

**mgr Marcina Bieleckiego**

**pt. „Charakterystyka białek kodowanych przez operon *hmu* z *Porphyromonas gingivalis*  
i innych bakterii”**

Badania mechanizmów pozyskiwania żelaza i hemu przez bakterie, tworzące biofilm przylegający do tkanek, w których osadzone są zęby, prowadzą do coraz głębszego zrozumienia patogenezы paradontozy i innych chorób, uwarunkowanych stanem zapalnym, rozwijającym się w tych miejscach w odpowiedzi na obecność bakterii oraz wydzielanych przez nie czynników. W przypadku głównego patogenu chorób przyzębia – beztlenowej gram-ujemnej bakterii *Porphyromonas gingivalis* – ważną rolę w procesie pobierania hemu odgrywa zewnątrzkomórkowy hemofor – białko HmuY, którego struktura i funkcja scharakteryzowana została szczegółowo w ostatnich latach, m.in. przez grupę badawczą prof. dr hab. Teresy Olczak w Zakładzie Biochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Białko to oraz jego homologi, produkowane przez dwa inne periodontopatogeny – bakterie *Tannerella forsythia* (białkoTfo) i *Prevotella intermedia* (białka PinA i PinO) były obiektem dalszych badań, przedstawionych przez członka tego zespołu – mgr Marcina Bieleckiego – w jego rozprawie doktorskiej.

Przeprowadzone przez doktoranta badania biegły dwutorowo. Jednym z zadań było uzupełnienie fizykochemicznej charakterystyki oddziaływania białka HmuY z hemem o cechy, dotąd nie rozpoznane, przynajmniej w wybranych szczegółach. Uzyskano dwie nowe informacje o mechanizmie tego procesu.

- 1) Przy zastosowaniu pomiarów dichroizmu kołowego kompleksów różnych metaloporfiryn z rekombinowanym białkiem HmuY typu dzikiego oraz jego wariantami z podstawionymi resztami His134 i His166, wykazano różny względny udział tych reszt w koordynacji metalu.

Okazało się, że obie reszty histydyny zaangażowane były w wiązanie Co(III)PPIX, podobnie jak to jest w przypadku kompleksu hem-HmuY. W przypadku innych metaloporfiryn koordynacja metalu zachodziła przy udziale tylko jednej z tych reszt histydyny.

- 2) Analiza widm fluorescencji białka HmuY typu dzikiego oraz jego wariantów, w których jedna z trzech reszt tryptofanu (W51, W73 lub W161) zastąpiona została resztą alaniny lub tyrozyny, wykazała zróżnicowaną rolę tych reszt w oddziaływaniu z hemem. Badania procesu denaturacji termicznej wykazały ponadto zachodzenie znacznych zmian konformacji tych białek w trakcie wiązania hemu, przy czym zmiany te miały różny charakter w mikrootoczeniu każdej z reszt Trp.

Drugi kierunek badawczy dotyczył homologów białka HmuY, a jego punktem wyjściowym było otrzymanie po raz pierwszy rekombinowanych białek Tfo oraz PinA i PinO, przy czym w przypadku Tfo sukces osiągnięto dzięki dostrzeżeniu błędów w sekwencji przypisanej białku w bazie danych i posłużeniu się sekwencją skorygowaną. Białka te poddano następującym dalszym badaniom.

- 1) Analiza podobieństwa sekwencji tych białek do HmuY wykazała, że w homologach HmuY nie ma zachowanych w odpowiednich pozycjach dwóch reszt histydyny, istotnych dla wiązania hemu przez HmuY. Podobieństwo sekwencji białek Tfo, PinA i PinO do HmuY i dwóch innych homologicznych białek o znanej strukturze przestrzennej z bakterii *Bacillus fragilis* i *B. vulgatus* umożliwiło wymodelowanie struktur trzeciorzędowych badanych homologów HmuY. W modelach tych wyraźnie dostrzec można różnice w konformacjach regionów, które w białku HmuY biorą udział w wiązaniu hemu.
- 2) Mimo tych różnic, białka Tfo, Pin A i PinO posiadały zdolność wiązania hemu, co wykazano na podstawie analizy zmian widm UV-Vis hemu po jego przyłączeniu przez te białka. Widma kompleksów hemu z homologami HmuY różniły się wieloma szczegółami od widma kompleksu hem-HmuY. Pod tym względem, najbardziej podobny do tego ostatniego wydawał się kompleks hemu z PinO. Autor zauważył ogólne podobieństwo widm kompleksów hemu z homologami HmuY do widm kompleksów hemu z wariantami HmuY, pozbawionymi jednej lub obu reszt histydyny, zaangażowanych w wiązanie ligandu przez białko HmuY. Z badań tych wyprowadzono wniosek, że w koordynacji atomu żelaza w kompleksach hemu z homologami HmuY biorą udział inne reszty aminokwasowe, być może reszty metioniny.
- 3) Miareczkując białka Tfo, PinA i PinO hemem i monitorując powstawanie kompleksów poprzez pomiary spektrofotometryczne lub spektrofluorometryczne, wyznaczono krzywe wiązania ligandu, na podstawie których oszacowano (moim zdaniem nieprecyzyjnie, patrz niżej) stałe dysocjacji kompleksów, informujące o mocy oddziaływania hemu z tymi białkami.
- 4) Na podstawie analizy zmian widm UV-Vis kompleksów hemu z białkami Tfo, PinA i PinO po dodaniu białka HmuY, wykazano, że HmuY szybko odbiera hem tym innym białkom. Jest to

intrygująca obserwacja, sugerująca, że HmuY – hemofor głównego patogenu chorób przyzębia (*P. gingivalis*) - wspomaga się niejako w tej funkcji, wykorzystując właściwość słabszego wiązania hemu przez białka, uwalniane do środowiska przez inne bakterie, występujące w zakażonej tkance.

- 5) Przeprowadzono porównawczą analizę zmian widm UV-Vis kompleksów hemu z białkami HmuY, Tfo, PinA i PinO pod wpływem redukcji centralnego jonu żelaza w hemie.
- 6) Analiza widm dichroizmu kołowego białka HmuY i jego homologów, oraz kompleksów tych białek z hemem sugerowała, że białka te charakteryzują się bardzo podobną strukturą drugorzędową. Pod tym względem, nieco odbiega od pozostałych białko PinA, co autor niezbyt przekonująco tłumaczy większymi (o 25 reszt aminokwasowych) rozmiarami tego białka. Co ciekawe, po związaniu hemu, w żadnym z białek nie zaobserwowano zmian widm dichroizmu kołowego, co sugeruje brak dostrzegalnych zmian w ogólnym planie struktury drugorzędowej w tych potencjalnych hemoforach.
- 7) Sporo uwagi poświęcił autor rozprawie wpływowi badanych białek na hemoproteiny gospodarza, a zwłaszcza sprawdzeniu możliwości odbierania im hemu. Cecha ta jest dobrze udokumentowana w przypadku białka HmuY. Niestety, nie udało się wykazać przejmowania hemu z kompleksu z albuminą przez białka PinA i PinO, ani z methemoglobiny przez wszystkie trzy homologii białka HmuY.
- 8) Sprawdzono również, czy homologii HmuY zdolne są do utleniania oksyhemoglobiny do methemoglobiny – formy, słabiej wiążącej ligand i tym samym potencjalnie łatwiejszej do wykorzystania jako źródło żelaza przez patogeny rezydujące w przyzębiu. Wykazano, że białka Tfo, PinA i Pin O znacząco przyspieszały proces utleniania hemoglobiny w porównaniu z kontrolą (samą oksyhemoglobina), jednak skala czasowa procesu (>17 godzin) każe powątpiewać w biologiczną istotność tego zjawiska.
- 9) Autor rozprawy wykonał też wiele prób, zmierzających do uzyskania kryształów białka HmuY i jego homologów o jakości, umożliwiającej badania dyfrakcji rentgenowskiej w celu rozwiązania struktury trzeciorzędowej białek. Na razie wysiłki te nie zostały uwieńczone sukcesem, ale niewątpliwie warto je kontynuować.

Jak wynika z powyższego przeglądu, doktorant przedstawił imponującą ilość danych doświadczalnych, które uzyskał na drodze drobiazgowych i często bardzo czasochłonnych badań, z zastosowaniem różnorodnych metod, obejmujących sztukę produkcji białek rekombinowanych i ich oczyszczania, technikę ukierunkowanej mutagenezy, bioinformatyczną analizę sekwencji białek i oparte na homologii modelowanie struktury trzeciorzędowej białek, spektrofotometrię UV-Vis, spektrofluorymetrię, pomiary dichroizmu kołowego a także podstawy techniki krystalizacji białek. Nie

ulega wątpliwości, że praca ta dostarczyła wielu nowych informacji o białku HmuY – znanym już hemoforze bakterii *P. gingivalis* – i jego homologach z bakterii, występujących w objętych stanem zapalnym przyzębiu. Tym samym wyniki te wnoszą znaczący wkład w rozumienie procesów pobierania żelaza i hemu przez periodontopatogeny – istotnej składowej molekularnych mechanizmów rozwoju chorób przyzębia. O wysokiej wartości tych badań świadczy m.in. fakt, że większość z przedstawionych w rozprawie wyników wykorzystano do przygotowania pięciu pełnych artykułów oryginalnych, które zostały już opublikowane w latach 2011-2015 a których współautorem (w jednym przypadku pierwszym) jest M. Bielecki. Lista tych publikacji podana została na końcu rozprawy, z dokładnym opisem udziału doktoranta w każdej z nich. Są to znakomite prace, opublikowane w tak renomowanych czasopismach jak *PLoS One*, *Metallomics*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* i *BMC Biochemistry*.

Skoro prace te spełniły surowe kryteria redakcyjne tych czasopism, a także wnikliwe oceny powołanych przez redakcje recenzentów, rola recenzenta rozprawy doktorskiej opartej na tych publikacjach mogłaby właściwie ograniczyć się tylko do oceny formalnej – redakcyjno-językowej. A jednak w trakcie lektury rozprawy nasunęły mi się dwie uwagi natury merytorycznej i proszę o rozwianie tych wątpliwości w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej.

Pierwsza z tych uwag dotyczy badań nad denaturacją termiczną białka HmuY i jego wariantów z resztami tryptofanu podstawionymi resztami alaniny lub tyrozyny. Niezależnie od redakcyjnych zastrzeżeń odnośnie tej akurat części (zamieszczonych poniżej), rzuca się w oczy bardzo duża różnica pomiędzy temperaturami topnienia białka typu dzikiego i wariantu W51A. Wynosi ona prawie 23 stopnie. Nie jestem pewien, czy szeroko opisywany w literaturze dotyczącej tego rodzaju podejścia „efekt jamy” jest wystarczającym wytłumaczeniem tak wielkiej różnicy. Jakiego rzędu różnice obserwowano przy tego typu podstawieniach w badaniach nad innymi białkami z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenyzy? A może rekombinowane warianty białka HmuY, pozbawione strukturalnie istotnej reszty tryptofanu są po prostu inherentnie niestabilne i dopiero wiązanie hemu stabilizuje ogólną strukturę trzeciorzędową białka? Ani w rozprawie, ani w publikacji przedstawiającej te badania (Bielecki i inni, *BMC Biochemistry* 2014) nie znalazłem przekonujących dowodów na „konformacyjną jakość” mutantów (np. widm dichroizmu kołowego), chociaż wątpliwości co do takiej jakości nie mam w przypadku zamian tryptofanu na tyrozynę.

Druga uwaga dotyczy grupy wyników, których na szczęście nie ma w żadnej z wymienionych publikacji. Jest to analiza krzywych wiązania hemu przez białka Tfo, PinA, PinO i HmuY (rys. 30 i 31), prowadząca do parametrów, zebranych w tabelach 6 i 7. Moim zdaniem, analiza ta jest

nieprawidłowa. Opiera się na wpisanej w program Origin rutynowej analizie kooperacyjnego działania *enzymów*, z wykorzystaniem równania Hilla. Ta analiza odbywa się w układzie współrzędnych z *całkowitym stężeniem ligandu* (zwykle substratu) na osi odciętych i *szybkością reakcji enzymatycznej* na osi rzędnych. Dlatego w tabelach widzimy parametr  $V_{max}$ , czyli maksymalną szybkość reakcji. Ale badane białka przecież nie są enzymami, a analiza dotyczy wiązania ligandu. Wiązanie ligandów przez białka analizuje w układzie współrzędnych z *równowagowym stężeniem ligandu wolnego* na osi odciętych a na osi rzędnych - jakimś wyrażeniem *stopnia wiązania ligandu* - zwykle *stężeniem ligandu związanego*, ale czasem też frakcją białka związanego z ligandem. Eleganckie przykłady prawidłowych izoterm wiązania znajdują się w pracy Wojtowicz, Bielecki i inni, *Metallomics* 2013 (jednej z pięciu, cytowanych jako podstawa rozprawy doktorskiej) – dotyczą akurat wiązania różnych metaloporfiryn przez białko HmuY (prawy panel rysunku 1). Wewnętrzny błąd analizy, proponowanej przez doktoranta, najwyraźniej widać w tabeli 7, która zawiera parametry dopasowania krzywych, otrzymanych na drodze pomiarów spektrofluorymetrycznych i przedstawionych na rys. 31, gdzie na osi rzędnych odkładana jest frakcja białka związana z ligandem. Może mieć co najwyżej wartość 1, a w tabeli znajdujemy wartość nawet 1,4. Dane z rys. 31 najłatwiej skorygować, odejmując od całkowitego stężenia hemu stężenie hemu związanego (obliczone z frakcji białka, wysyczonej hemem) i dopiero te różnice odkładając na osi odciętych. W ten sposób wartości stałych dysocjacji w tabeli 7 przesuną się z 2,96 do ok. 0,46  $\mu\text{M}$  dla białka HmuY (co jest wartością bardziej godną prawdziwego hemoforu), z 7,047 do ok. 4,5  $\mu\text{M}$  dla PinA i z 5,44 do ok. 2,94  $\mu\text{M}$  dla Tfo.

Inna sprawa to wybór modelu Hilla (czyli kooperacji pomiędzy kilkoma miejscami wiązania ligandu w jednej cząsteczce białka). Zwykle analizę izoterm wiązania zaczyna się od najprostszego dopasowania (model Scatcharda) a potem dopasowuje się bardziej skomplikowane modele, statystycznie sprawdzając poprawienie fitu (służy do tego m.in. test F Snedecora). Zatrzymujemy się na ostatnim z kolejnych, coraz bardziej skomplikowanych modeli, dla którego poprawienie sumy kwadratów odchyień było jeszcze statystycznie istotne. Czy doktorant dysponuje takimi obliczeniami?

Ale skoro już przypisano uzyskanym danym model Hilla, to proszę o podanie argumentów, że wiązanie hemu przez analizowane białko może istotnie mieć charakter kooperacyjny. W rozprawie doktorskiej autor nie przedyskutował tego aspektu, ani nie podjął próby interpretacji uzyskanych wartości współczynnika Hilla.

Formalną ocenę poszczególnych części rozprawy doktorskiej mgr M. Bieleckiego pod względem treści, redakcji tekstu, materiału ilustracyjnego, terminologii i strony językowej wypada mi rozpocząć od uwagi, że tytuł pracy jest niezbyt trafnie sformułowany - sugeruje, że operon o nazwie *hmu* występuje w innych bakteriach niż tylko *P. gingivalis*. Zręcznie byłoby ponadto zaznaczyć w tytule, że

inne niż *P. gingivalis* gatunki bakterii, badane w opisanej pracy, to patogeny chronicznych chorób przyzębia.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 111 stron tekstu i jest podzielona w sposób tradycyjny na rozdziały, z których główne to kolejno: wstęp (22 strony), opis materiałów i metod (15 stron), opis uzyskanych wyników (35 stron), dyskusja (9 stron) i wykaz piśmiennictwa (14 stron).

Niekonwencjonalnym zabiegiem jest umieszczenie celu pracy przed wstępem a zaraz po streszczeniach w języku polskim i angielskim. Osobiście nie mam nic przeciwko temu, aczkolwiek czytelnik mógłby być zaskoczony informacją, że celem jest „dalsza” charakterystyka białka HmuY, jeśli nie wie jeszcze, że była jakaś charakterystyka wcześniejsza. Poważniejszą sprawą jest zbyt ogólne sformułowanie celów pracy, nie informujące, jakie właściwie badania mają być przeprowadzone. Innymi słowy – na czym ma polegać „dalsza charakterystyka białka HmuY...” albo „zapoczątkowanie badań nad mechanizmami przyswajania hemu z udziałem wybranych homologów białka HmuY...”?

Rozdział wstępny jest dobrym wprowadzeniem w tematykę badawczą pracy. Napisany ciekawie, aczkolwiek miejscami chaotycznie, zawiera szereg informacji o mechanizmach przyswajania żelaza i hemu przez bakterie gram-ujemne, roli syderoforów i hemoforów, regulacji homeostazy żelaza i hemu w komórkach bakterii, patogenezie chorób przyzębia, szczegółowym mechanizmie przyswajania żelaza i hemu przez bakterie *P. gingivalis*, *T. forsythia* i *P. intermedia*, a w odniesieniu do pierwszej z tych bakterii – także mechanizmach regulacji tych procesów. Zastanowił mnie brak jakiegokolwiek wzmianki o zachodzeniu podobnych procesów w trzeciej bakterii „kompleksu czerwonego” (tego „najgorszego”), czyli *Treponema denticola*. Drobnymi potknięciami redakcyjnymi w tej części są: nieadekwatność tytułu podrozdziału 1.2. „Przyswajanie żelaza i hemu przez bakterie gramujemne”, który poświęcony jest głównie białkom wiążącym żelazo lub hem, występującym w organizmie ludzkim; zbędność rysunku 11 ze schematem operonu *hmu*, który pojawia się za chwilę na rysunku 13, porównywany z homologicznymi operonami z innych badanych bakterii, oraz pomyłki w opisie tych operonów w tekście (str. 30), gdzie wymienia się nie pokazane na rys. 13 białka Bfo\_2007 i Bfo\_2006. Wydaje mi się, że w kontekście tematyki, poruszanej w pracy, zamiast o jonach  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  lepiej byłoby mówić o żelazie na +II i +III stopniu utlenienia - Fe(II) i Fe(III). Uwaga ta dotyczy również dalszych części rozprawy.

Opis zastosowanych materiałów i metod jest poprawny - zwięzły, ale w zupełności wystarczający. W części tej natknąłem się na kilka niezręczności terminologicznych lub językowych. Uważam, że „peleta” to określenie wzięte z żargonu laboratoryjnego. Chromatografię hydrofobową lepiej nazywać chromatografią oddziaływań hydrofobowych. Wielkość, mierzona w spektrofotometrii

absorpcyjnej prawidłowo powinna być nazywana absorbancją a nie absorpcją. Jest to oficjalna terminologia IUPAC. Absorpcja to zjawisko pochłaniania światła. Współczynnik  $\epsilon$  (epsilon) w równaniu Lamberta-Beera oficjalnie nazywa się molowym współczynnikiem absorpcji. Uwagi te dotyczą też dalszych części rozprawy. Wielkość porów w filtrach do klarowania roztworów białek to 0,22  $\mu\text{m}$ , a nie 0,22 nm (str. 37, ostatnia linia). Niezręcznie brzmi „dodawanie trzech powtórzeń do płytek” (str. 40). W opisach procedur krystalizacji białek autor w osobliwy sposób posługuje się słowem „warunki”, jakby był to jakiś namacalny, konkretny przedmiot. Hołdując zasadzie czystości języka ojczystego, czuję się nieswojo, czytając: „warunki reakcji przygotowywano ręcznie”, „przygotowano płytki z komercyjnie dostępnymi warunkami” czy „płytki, zawierające komercyjnie dostępne warunki”, itd.

Opis uzyskanych wyników, przedstawiony w kolejnym rozdziale, jest zasadniczo zgodny z ogólnie przyjętymi standardami. Rozdział ten zawiera starannie przygotowany materiał ilustracyjny, w większości zaczerpnięty z wcześniej opublikowanych artykułów, których współautorem jest doktorant. Oczywiście, w rozprawie znalazły się ilustracje tylko tych wyników, które doktorant osobiście otrzymał. Niekiedy podpisy rysunków i tabel są zbyt zwięzłe. Dane, przedstawione w podrozdziale 3.3 „Analiza stabilności białka HmuY i jego wariantów” są niespójne - wartości temperatur topnienia badanych białek, podane w tabeli 3, są o 10 stopni niższe niż te, które odczytać można na rysunku 18. Czy to jest zwykły błąd, czy można to jakoś inaczej wytłumaczyć? Niezbyt jasna jest interpretacja widm dichroizmu kołowego kompleksów metaloporfiryn z białkiem HmuY typu dzikiego lub jego wariantami z podstawionymi resztami histydyny (rys. 16). Najlepiej ilustruje ją zasadnicza sprzeczność dwóch zdań na początku strony 48, zaczynających się do słów: „Otrzymane wyniki dla kompleksów białek z Ga(III)PPIX i Zn(II)PPIX...” i „Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku Cu(II)PPIX i Ni(II)PPIX...”. Inne potknięcia w prezentacji wyników przez doktoranta są już mniejszego kalibru. Na rysunku 15 gradient powinien być narysowany jako malejący, bo w chromatografii oddziaływań hydrofobowych białka wymywane są przez obniżanie stężenia siarczanu amonu. Czy konduktometr rzeczywiście mierzy napięcie? W podpisie rysunku 26 nie wyjaśniono, że czerwony kolor oznacza białko HmuY (choć tego łatwo można się domyślić). Na szeregu rysunków należałoby poprawić opis osi rzędnych – zamiast „Absorpcja” powinno być „Absorbancja” (patrz wyżej). Rysunki 34 i 35 to podwójna prezentacja tych samych widm dichroizmu kołowego. Niedociągnięciami terminologicznymi są: nazywanie masy cząsteczkowej białka, wyrażanej w kDa, krótko masą (masę wyraża się w gramach) albo „wielkością białka”; nazywanie liczby reszt aminokwasowych w białku „długością białka”, czy używanie słowa substrat zamiast ligand (str. 73, 75). W języku polskim przedrostek „oksy” nie powinien być pisany przez „x”.



W kolejnym rozdziale autor dyskutuje uzyskane przez siebie wyniki – jak na mój gust zbyt skrótowo, biorąc pod uwagę dużą liczbę uzyskanych danych i ich doniosłe znaczenie dla wiedzy o fizykochemii wiązania hemu przez białka czy mechanizmach patogenezы chorób przyzębia. Muszę jednak przyznać, że przedyskutowane zostały wszystkie najważniejsze wątki pracy, a zatem dyskusja jest wystarczająca.

Rozprawę kończy lista piśmiennictwa, obejmująca 149 pozycji. Są to w znacznej części publikacje z ostatniej dekady. Dowodzi to dobrego przygotowania doktoranta do prowadzenia zaplanowanych badań.

#### Podsumowanie

W recenzji rozprawy doktorskiej mgr M. Bieleckiego wskazałem na kilka niedoskonałości tego opracowania, jednak uwagi te są w znacznej mierze formalne. Nie mogą one przesłonić zasadniczej zalety rozprawy, jaką jest przedstawienie dużej ilości wyników o ogromnej wartości poznawczej, uzyskanych samodzielnie przez doktoranta przy zastosowaniu wielu nowoczesnych metod badawczych i w znacznej większości już opublikowanych w czasopismach biochemicznych wysokiej rangi.

Stwierdzam zatem, że praca doktorska mgr Marcina Bieleckiego spełnia zwyczajowe wymogi merytoryczne, redakcyjne, terminologiczne i językowe, stawiane rozprawom doktorskim z zakresu biochemii oraz formalne wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 r. Wysoką Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego proszę o przyjęcie mojego wniosku o dopuszczenie mgr Marcina Bieleckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

