

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

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Ambroziak zatytułowana
„Translokon SEC jako mediator odpowiedzi komórki na zaburzenie pozacytoplazmatycznej
homeostazy u bakterii *Helicobacter pylori*”

Rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Ambroziak jest oryginalnym opracowaniem liczącym 181 stron maszynopisu. Podział pracy jest prawidłowy, w klasycznym układzie rozdziałów stosowanym przy eksperymentalnych rozprawach doktorskich.

Tematem pracy jest analiza funkcjonalna białka SecA i jego wariantów w utrzymaniu homeostazy proteomu przestrzeni periplazmatycznej komórek *Helicobacter pylori*. Można z dużym prawdopodobieństwem powiedzieć, że pierwsze komórki były wyposażone w pojedynczą błonę komórkową jak obecne bakterie Gram dodatnie. Z czasem okazało się, że posiadanie dodatkowego bufora między wnętrzem komórki a „resztą świata” jest dobrym pomysłem co zaowocowało powstaniem komórek Gram ujemnych. Jednak pojawienie się dodatkowej przestrzeni międzybłonowej rozwiązywało część pierwotnych problemów w zamian dodając nowe. Tym nowym problemem jest transport i utrzymanie homeostazy komponentów komórkowych znajdujących się w przestrzeni międzybłonowej oraz przemieszczanie makromolekuł do środowiska otaczającego komórkę w poprzek dwóch błon komórkowych. Aby sprostać nowym wyzwaniom komórki bakterii Gram ujemnych wytworzyły cały szereg sposobów na przemieszczanie białek w poprzek błon komórkowych. I w ten sposób dochodzimy do białka SecA, które jest składnikiem jednego z najważniejszych czy też najczęściej wykorzystywanych

przez komórkę systemów przemieszczania białek. Uwagę autorki przyciągnęło spostrzeżenie, że usunięcie białka opiekuńczego funkcjonującego w przestrzeni międzybłonowej (HtrA) albo prowadzi do efektu letalnego albo do pojawienia się kilku zmian w C-końcowej części białka SecA. Wyjaśnieniu znaczenia tych zmian oraz precyzyjnemu określeniu współzależności między białkiem SecA a HtrA oraz pozostałymi składnikami komórki poświęcona jest recenzowana rozprawa doktorska.

Wstęp

Rozdział ten, liczący 30 stron jest poprzedzony spisem stosowanych skrótów. Jest to gradka dla recenzenta, ponieważ prawie zawsze można coś tam znaleźć. W spisie skrótów rozprawy doktorskiej Pani mgr Ambroziak, zauważam pewną niekonsekwencję wyrażającą się podawaniem tylko pełnej nazwy skrótu w j. angielskim bez jej tłumaczenia na język polski. Dalsza lektura rozdziału „wstęp” wprowadza czytelnika w zagadnienia związane bezpośrednio z tematem rozprawy, czyli sposobami lub systemami stosowanymi przez komórki do przemieszczania białek w poprzek błon komórkowych lub ich umieszczeniu wewnątrz tych ostatnich. Autorka opisuje różnice w sposobie działania tych systemów u różnych gatunków bakterii wyjaśniając również na tyle ile to możliwe ich przeznaczenie. Rozdział jest napisany jasnym i zrozumiałym językiem. Mimo dbałości Autorki o klarowność tekstu chciałbym zwrócić fragmenty, gdzie nieuporządkowanie bierze górę: i) na str. 23, mniej więcej w połowie akapitu wspomina Pani o systemie SEC znajdującym się w błonie zewnętrznej...; ii) zgadzam się że białko SecA może być celem nowych czynników antybakteryjnych, ale chyba nie ono samo jest obiektem badań nad lekami antybakteryjnymi (str. 30); iii) dość interesująco oddziela Pani ruchliwość bakterii od chemotaksji (str. 41-42). Mogę poprosić o kilka słów komentarza, ponieważ w mojej ocenie oba zachowania są praktycznie tożsame; iv) czy rozluźnienie połączeń między komórkami nabłonkowymi rzeczywiście umożliwia bakteriom „transmigrację” poprzez komórki nabłonka czy też może między nimi (str. 45)?

Rozdziały „Materiały” i „Metody”

Pani Ambroziak 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 kilka malutkich błędów (tab. 7, str. 55 – znaki dziesiętne, str. 74 – za „moich czasów” siarczan amonu miał inny wzór sumaryczny) – szczerze gratuluję precyzji zapisu. Równie skrupulatnie zostały opisane procedury doświadczalne stosowane podczas prowadzonych badań. Miałbym tylko kilka małych pytań: czy rzeczywiście bakterie zaszczepiano do OD=0,5 (str. 76, metoda 6.1.4)? Metoda „kolonijna reakcja PCR” brzmi dla mnie trochę niezręcznie. Czy nie byłoby lepiej „reakcja PCR z komórkami bakterii”? Bardzo mi się podoba w opisach warunków wirowania podawanie siły odśrodkowej zamiast prędkości obrotowej. Jednak nie jest to „prędkość 8000g” i temu podobne w dalszej części metod (str. 79). Czy rzeczywiście zaszczepiano bakterie do 100ml LB w metodzie 6.22? Jeśli później hodowlę nocną rozcieńczano w stosunku 1:50 do końcowej objętości 500ml to hodowla nocna była przesadnie duża. W jaki sposób obliczano „ilość wyrosniętych kolonii” (metoda 6.31.3)? Może po prostu je liczono?

Wyniki

Rozdział ten ma objętość 52 stron i zawiera opis uzyskanych wyników przez Panią mgr. Ambroziak. Objętość tego rozdziału liczona w stronach tekstu nie oddaje w żaden sposób zakresu i różnorodności przeprowadzonych analiz. Autorka rozpoczyna swoją drogę od stosunkowo prostych doświadczeń dostosowując swój warsztat do uzyskiwanych wyników oraz potrzeb. W trakcie lektury tego rozdziału mamy możliwość przeczytać o bardzo szerokim wachlarzu wykorzystanych przez Autorkę metod z zakresu mikrobiologii, inżynierii genetycznej, chemii, biofizyki i biochemii. 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 SecA metodą sączenia molekularnego. W opisie prowadzonych prac jest informacja o połączeniu frakcji od 12 do 17. Poproszę o dwa-trzy słowa komentarza, dlaczego? Patrząc na Ryc.10 frakcje 15 – 17 wydają się być lepiej oczyszczone z białka ArnA w stosunku do frakcji 12-14. Dlaczego zdecydowała Pani użyć sączenia molekularnego zamiast np. chromatografii jonowymiennej w celu doczyszczenia preparatu SecA?

W dalszej części rozdziału „Wyniki” mgr Ambroziak przeprowadziła pomiary parametrów kinetycznych związanych z hydrolizą ATP przez białko SecA. Zostało to wykonane w bardzo przekonujący sposób. Jednak mam pytanie: czy nie myślała Pani o przeprowadzeniu pomiarów np. stałej wiązania substratu przez białko SecA i jego analizowane warianty? Tempo hydrolizy ATP wskazuje na aktywność SecA, jednak w przypadku zmiany powinowactwa do substratu sam

pomiar hydrolizy ATP może być niewystarczający do pełnej charakteryzacji wariantu tego białka. Poproszę o kilka słów komentarza w kontekście konkluzji ze strony 126 pod tabelą 30.

Czy konstruując szczepy *H. pylori* z dodatkową kopią genu *secA* w miejscu plastyczności czy rozważyła Pani możliwość umieszczenia tam badanego genu pod kontrolą jego natywnego promotora i sekwencji regulatorowych? Jeśli ilość białka SecA jest ściśle kontrolowana w komórce, to wykorzystanie konstytutywnego, silnego promotora mogło spowodować o wiele poważniejsze zaburzenia w ekspresji operonu *secA-lolF*. Może warto by było przemyśleć rozdzielanie obu tych genów zapewniając ich ekspresję z fizjologicznego promotora?

Wydaje mi się, że usystematyzowanie genów wykorzystanych jako referencyjne w tabeli, w opisie analizy ekspresji *secA* i *lolF* poprawiłoby czytelność tego fragmentu (str. 135). Według jakich kryteriów dobierano geny referencyjne dla poszczególnych analiz qPCR?

Jedną z niedogodności prowadzenia badań naukowych jest brak ich końca. Zawsze pozostaje coś do sprawdzenia. Czy biorąc pod uwagę złożoność i różnorodność zaobserwowanych zmian w poziomie transkrypcji oraz ilości badanych białek nie dyskutowała Pani z Promotorem możliwości/zasadności analizy typu RNAseq w wybranych szczepach i warunkach? Jakie kombinacje uznała by Pani za najciekawsze pod względem poznawczym?

Dyskusja

Na kolejnych 20 stronach maszynopisu Doktorantka konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi dostępnymi w literaturze przedmiotu. Złośliwość materii (w tym wypadku ożywionej) nie dają w chwili obecnej możliwości, aby jednoznacznie wyjaśnić znaczenie poszczególnych mutacji w genie *secA* dla homeostazy komórki i zmian w poziomie ekspresji i ilości innych białek komórkowych. Obraz, który można zbudować na bazie przedstawionych wyników badań pokazuje złożoność oraz plastyczność komórkowych systemów utrzymana równowagi wśród białek przestrzeni międzybłonowej oraz ich transportu. Ponieważ mówimy o dużej części komórki Gram ujemnej i absolutnie niezbędnej do jej przeżycia trudno oczekiwać wyników czarno-białych, zero-jedynkowych. Mimo tego mgr Ambroziewicz przeanalizowała imponującą ilość czynników mogących wskazywać na sposób i jakość działania białka SecA. Może jeszcze na podstawie zaprezentowanych wyników nie można jednoznacznie powiedzieć, że jest tak lub inaczej, ale zdecydowanie ułatwią one stawianie kolejnych pytań w przyszłości, według zasady mówiącej: aby zadać właściwe pytanie trzeba znać choć część odpowiedzi.

Literatura

Spis literatury jest imponujący i liczy aż 239 pozycji. Stanowi to bardzo szeroką podstawę złożoną z dostępnych informacji do planowania, przeprowadzania i interpretacji prac badawczych.

Przedstawiona praca wnosi oryginalny wkład naukowy w wiedzę o procesach zachodzących w komórkach bakterii Gram ujemnych służących utrzymaniu równowagi pomiędzy przestrzeniami oddzielonymi błoną komórkową. Są to fundamentalne procesy życiowe a poznanie ich mechanizmu może w przyszłości zaowocować nawet nowymi metodami leczenia, o czym Autorka wspomina w swojej rozprawie. Droga do tego jest pewnie jeszcze daleka, ale badania podstawowe są niezbędne, aby to mogło stać się prawdą w przyszłości. Doktorantka wykazała się bardzo dużym kunsztem eksperymentatora planującego, przeprowadzającego oraz wyciągającego wnioski z uzyskanych wyników. Chciałbym po raz kolejny podkreślić bardzo szeroki zakres metod zastosowanych przez mgr Ambroziak podczas swojej pracy. Zdaję sobie sprawę, że w rozprawie zostały opisane tylko „udane” doświadczenia, ale ich ilość jest imponująca. Szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę ilość pracy jaka była niezbędna do ich realizacji. Wskazuje na duże umiejętności mgr. Ambroziak jako eksperymentatora posiadającego „złote ręce” w których każda stosowana metoda działa.

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 Patrycji Ambroziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Będąc pod wielkim wrażeniem ogromu pracy wykonanej przy realizacji tej pracy doktorskiej, niezwykle szerokiego wachlarza metod badawczych od najbardziej tradycyjnych doświadczeń mikrobiologicznych typu „posiej i zobacz co wyrośnie” do zaawansowanych nowoczesnych analiz bioinformatycznych (np. alpha fold). Co jest rzadko spotykane, tak szalenie zróżnicowane metody badawcze były zastosowane z dużym powodzeniem. Pani mgr Ambroziak jest również eksperymentatorem niepotykanej sprawności. Biorąc to wszystko pod uwagę wnoszę o uhonorowaniu rozprawy stosowną nagrodą.

M. Ochrowski