



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

Warszawa, 25. 06. 2018.

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 Michała Śmigi

Pan mgr Michał Śmiga przedstawił do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „Udział białka PgFur w wirulencji bakterii *Porphyromonas gingivalis*”, wykonaną na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Olczak.

Część merytoryczna rozprawy, liczącej w sumie 144 strony, rozpoczyna się od streszczeń w językach polskim i angielskim, po których kolejno następują Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia, spisy rysunków i tabel, a na końcu suplement, stanowiący wykaz publikacji Doktoranta.

Rozprawa jest napisana bardzo dobrym, klarownym językiem. Nieliczne błędy, głównie tzw. literówki nie są na tyle istotne, by wymieniać je w recenzji. Układ rozprawy jest przejrzysty, a strona ilustracyjna stoi na bardzo wysokim poziomie.

Streszczenie, tożsame w obu językach, pozwala czytelnikowi na uzyskanie orientacji w przedmiocie rozprawy.

W niespełna 20-stronicowym wstępie Autor zwięźle przedstawia aktualny stan wiedzy na temat bakterii i chorób przyzębia, w szczególności omawiając badane przez siebie bakterie *Porphyromonas gingivalis*. W wyczerpujący sposób opisano rodziny białek kluczowe dla wirulencji tych bakterii, a także organizmów pokrewnych. Opis ten stanowi świetny punkt startowy dla zapoznania się z wynikami rozprawy. Pragnę w tym miejscu szczególnie wyróżnić wykonane przez Autora ilustracje i schematy znanych oddziaływań omawianych klas białek. Nie mam uwag krytycznych do tej części, która napisana jest stylem bardzo żywym, świadczącym o dużym zaangażowaniu Doktoranta w dziedzinę swoich badań.

Cel pracy, mianowicie charakterystyka białka PgFur wraz z określeniem funkcji dwóch białek z rodziny Crp/Fnr będących pod kontrolą PgFur, przedstawiony został zwięźle, choć i szczegółowo, na jednej stronie rozprawy. Można powiedzieć, że jest to wzorcowe przedstawienie celu pracy doktorskiej.

Rzetelny i drobiazgowy opis stosowanych materiałów i metod badawczych zajmuje kolejne 30 stron. Doktorant przedstawia w nim skonstruowane przez siebie plazmidy (24, w większości służące do ekspresji zaprojektowanych przez siebie mutantów badanego białka PgFur), oligonukleotydy (ponad 100), szczepy bakteryjne, w tym 27 otrzymanych przez siebie szczepów *P. gingivalis*, a dalej metodykę hodowli bakterii i konstrukcji szczepów, metody analityczne, a dalej opis badań mikrobiologicznych, analiz genetycznych, otrzymywania białek Fur z *P. gingivalis* i *E. coli* i mutantów PgFur, a na koniec analiz *in silico* i statystycznych. Opis ten jasno świadczy o ogromnej pracy, wykonanej przez Doktoranta. Jedynym drobnym mankamentem, zidentyfikowanym przeze mnie w tej części rozprawy jest brak (albo brak przedstawienia) charakterystyki otrzymywanych białek rekombinowanych za pomocą spektrometrii mas.

Wyniki wykonanych doświadczeń mgr Maciej Śmiga przedstawia na 40 stronach rozprawy.

W pierwszym etapie badań Doktorant umiejscowił białko PgFur w szerokiej rodzinie Fur i zbadał jego homologię z białkami pokrewnymi. Z wyjątkiem prawie identycznego białka z *P. gulae* jest ona bardzo niska, na poziomie 20-30 %. Następnie na podstawie struktury białka PerR z *B. subtilis* wymodelował PgFur. Nie jasne jest dla mnie, na ile wiarygodne jest to modelowanie – nie podano informacji na temat homologii pomiędzy PerR i PgFur. Nie wiadomo również, czemu służy prezentacja tej struktury w tym miejscu rozprawy.

Badania eksperymentalne rozpoczęły się od prób wyjaśnienia roli białka PgFur za pomocą hodowli dwóch szczepów z delecją tego białka w różnych warunkach i pod wpływem różnych stresów. Zbadano również wpływ obecności białka na globalną ekspresję genów. Zaobserwowano zmiany w zależności od warunków hodowli, nie uzyskując jednak prostych związków przyczynowo-skutkowych. Doktorant potrafił jednak zinterpretować te wyniki w sposób wstępny, sugerując wpływ PgFur na skład błony zewnętrznej bakterii. Następnie wykonano badania udziału PgFur w pozyskiwaniu żelaza przez *P. gingivalis*. Istotnym wynikiem pozytywnym tej części badań jest stwierdzenie, że badane białko może być jednym z regulatorów biosyntezy białka HmuY, lecz jedynie w warunkach obfitości żelaza i hemu. W dalszych badaniach oceniono związki między obecnością PgFur i aktywnością proteaz,

szczególnie gingipain, a także procesy glikozylacji. We wszystkich tych eksperymentach zaobserwowano pewne efekty, zdecydowanie odmienne dla dwóch badanych szczepów *P. gingivalis*. Zjawisko to zaobserwowano bardzo wyraźnie w badaniach zdolności mutantów *P. gingivalis* do inwazji komórek gospodarza, w których stwierdzono znamienne statystycznie efekty dla niektórych oddziaływań. Można więc stwierdzić, że PgFur bierze udział w procesach inwazji i przeżywalności bakterii w komórkach eukariotycznych, ale jego rola bardzo zależy od kontekstu, wykazując zasadnicze różnice pomiędzy szczepami. W kolejnym etapie badań Doktorant postanowił sprawdzić funkcje PgFur na poziomie molekularnym. Rolę C-końca białka sprawdzono przez otrzymanie bakterii pozbawionych oryginalnego genu, ale eksprymujących odpowiednie mutanty delecyjne metodą komplementacji plazmidem umożliwiającym ekspresję mutantu. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę sekwencji ostatnich 13 reszt aminokwasowych, odmiennie od mutantu z delecją tylko 4 takich reszt. Niestety Autor nie podał kryteriów, według których dobrał te sekwencje. Następnie, otrzymując i badając szereg mutantów punktowych PgFur Doktorant zidentyfikował cztery reszty Cys wiążące funkcjonalny jon Zn(II). Nie udało się natomiast stwierdzić, czy PgFur reguluje operon *hmu*. W ostatnim etapie badań wykorzystano wyniki z mikromacierzy, w których zidentyfikowano dwa białka z rodziny Crp/Fnr, których ekspresja może być regulowana przez PgFur. Powtórzono więc schemat badań fizjologicznych, wykonanych uprzednio dla mutantów PgFur, z utworzonymi w tym celu mutantami delecyjnymi tych dwóch białek.

W trakcie raportowania wyników doświadczalnych Autor zamieścił zwięzłe podsumowania kolejnych etapów prac, co znakomicie ułatwia przyswajanie uzyskanych danych.

Dyskusja wyników zajmuje 14 stron rozprawy (wraz z Podsumowaniem 16). Zawiera ona twórczą i szczegółową analizę i korelację wyników doświadczalnych, dzięki czemu Doktorant w sposób przekonujący wyciągnął wnioski, świadczące o istotnej roli badanego białka jako regulatora procesów wzrostu i wirulencji *P. gingivalis*, zwłaszcza w początkowym etapie infekcji, przy obfитоści źródeł żelaza i potencjalnym ataku tlenowym. Doktorant bez wątplenia wykazał wyjątkowość białka PgFur, które nie wiąże jonów żelaza w postulowanym miejscu regulatorowym, na tle białek z rodziny Fur, które w większości to robią, lecz za to jest regulatorem procesów pozyskiwania żelaza i ochrony przed stresem oksydacyjnym..

Jedynym większym mankamentem Dyskusji jest brak syntetycznego zestawienia porównawczego wyników uzyskanego dla delecji Crp i Crp/Fnr z wynikami dla delecji PgFur, które pomogłoby czytelnikowi w zorientowaniu się w Dyskusji tej części Rozprawy.

Znaczna część wyników została opublikowana w czterech (lub pięciu, w zależności od statusu ostatniego z nich w wydawnictwie) artykułach naukowych w dobrych czasopismach międzynarodowych, co potwierdza ich ważkość.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedłożona do oceny praca p. mgr Michała Śmigi 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.

