

Gdańsk, 04.07.2019

Prof. dr hab. Michał Obuchowski
Zakład Bakteriologii Molekularnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Zarzeckiej zatytułowanej
„Charakterystyka homologów HtrA bakteryjnych patogenów człowieka,
Helicobacter pylori i *Stenotrophomonas maltophilia*”**

Konieczność adaptacji organizmów do otaczającego je środowiska została zauważona i opisana już przez Karola Darwina w jego najśłynniejszym dziele „*O powstawaniu gatunków*” opublikowanym 160 lat temu. Rozwój nauk biomolekularnych dostarczył tylko kolejnych dowodów na poparcie tej tezy. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w szeroki nurt badań nad możliwościami i mechanizmami adaptacji organizmów do zmiennych warunków środowiska, w tym, do środowiska wewnętrznego innych organizmów w relacji gospodarz-patogen na poziomie molekularnym, przyjmując jako obiekt swojego zainteresowania białko HtrA i jego homologi. Jak zostało przedstawione w tytule jednego z artykułów składających się na rozprawę doktorską, białko to może być potencjalnym celem terapeutycznym lub antygenem służącym do wytworzenia szczepionki. To z kolei stwierdzenie wpisuje się w przybierające na sile zaniepokojenie wzrastającą lekoopornością mikroorganizmów, które z punktu widzenia ochrony zdrowia w niedalekiej przyszłości będzie bardzo istotne. Obie kwestie, funkcja i rola białka HtrA oraz wzrastająca lekooporność są przejawem tego samego procesu – adaptacji do zmian w środowisku. Ponieważ trudno oczekiwać od ludzi, że zaakceptują, iż pewna część populacji zostanie wyeliminowana przez bakterie, badania nad funkcją i rolą homologów białka HtrA mogą pozwolić na opracowanie nowych strategii terapeutycznych, choć należy przypuszczać, że będą to tylko działania wspomagające leczenie. Oprócz aspektu użytkowego wyników badań Pani mgr Zarzeckiej, jej rozprawa dotyczy badań podstawowych, które mogą umożliwić przeanalizowanie dostosowania parametrów homologów HtrA do środowiska bytowania analizowanych gatunków bakterii.

Rozprawa doktorska mgr Urszuli Zarzeckiej jest przygotowana w formie cyklu publikacji. Całość została zaopatrzona w streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku naukowego, listę artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz pełną treść artykułów w języku angielskim wchodzących w skład rozprawy wraz z oświadczeniami autorów.

Dorobek naukowy Pani Zarzeckiej składa się z siedmiu artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach specjalistycznych. Sześć z nich to prace oryginalne, jeden to praca przeglądowa. Uważam, że dorobek siedmiu artykułów opublikowanych w dobrych czasopismach, jest bardzo dobrym wynikiem.

Na rozprawę doktorską składają się m.in. trzy ze wspomnianych powyżej siedmiu, opublikowane odpowiednio w:

- i) *Current Medical Chemistry*, doktorantka jest trzecim autorem z siedmiu, praca przeglądowa, wkład doktorantki - przygotowanie podrozdziału o homologue białka HtrA z *Helicobacter pylori*, przygotowanie jednej ryciny i jednej tabeli;
- ii) *International Journal of Biological Macromolecules*, doktorantka jest pierwszym autorem z dwunastu, praca oryginalna, wkład doktorantki - zaplanowanie i skonstruowanie plazmidu nadprodukującego nieaktywne białko HtrA_{Sm}, oczyszczenie tego białka, przebadanie jego aktywności proteolitycznej i opiekuńczej, specyficzności substratowej, analiza oligomeryzacji oraz przygotowanie próbek do pomiaru dichroizmu kołowego. Ponadto brała udział w przygotowaniu manuskryptu oraz rycin 1-5 i 7-8 oraz tabel 1, 2 i 5;
- iii) *Frontiers in Microbiology*, doktorantka jest pierwszym autorem z dziesięciu, praca oryginalna, wkład doktorantki - konstrukcja plazmidów nadprodukujących homologi HtrA z *Helicobacter pylori*, oczyszczenie białek, analiza aktywności proteolitycznej, ustalenie optymalnych warunków działania ww. enzymów, analiza specyficzności substratowej, analiza oligomeryzacji, sączenie molekularne ww. białek, przygotowanie próbek do pomiaru dichroizmu kołowego, analiza przeżywalności bakterii *H. pylori* pozbawionej genu *htrA* w różnorodnych warunkach stresowych. Ponadto brała udział w przygotowaniu manuskryptu, rycin 1-6 i 8, rycin S2-S5 oraz tabeli 1-3 i S1.

Ponieważ wyżej wymienione prace zostały już poddane krytycznej analizie podczas procesu ich publikacji, nie będą tego robić powtórnie.

Bazując na treści artykułów stanowiących rozprawę doktorską oraz załączonych oświadczeniach współautorów mogę stwierdzić, że w przypadku dwóch prac oryginalnych mgr Urszula Zarzecka wykonała zdecydowaną większość prac badawczych a jej rola w pracy była wiodąca. Podczas realizacji badań opisanych w ww. artykułach Doktorantka wykazała się umiejętnością pracy laboratoryjnej, biegłością w stosowaniu zróżnicowanych technik badawczych (klonowanie, oczyszczanie białka, analizy biochemiczne lub biofizyczne, analizy fenotypu bakterii) stanowiących obecny warsztat mikrobiologa/biochemika/biologa molekularnego. Wykazała się również dojrzałym i krytycznym podejściem do swoich wyników, które to zostało zaakceptowane przez środowisko, ponieważ jej prace zostały dopuszczone do druku. Uzyskane wyniki, może w chwili obecnej nie pozwalają na opracowanie nowych metod walki z bakteriami patogennymi, ale wskazane różnice zarówno w optymalnych warunkach działania enzymów, ich specyficzności substratowej oraz oligomeryczności pozwalają przypuszczać, że próba opracowania terapii wykorzystującej jako cel homologi białka HtrA bakterii patogennych może się udać. Uzyskane dane stanowią oryginalny wkład w poznanie biologii bakterii na poziomie molekularnym.

W przypadku pracy przeglądowej wkład Doktorantki nie jest aż tak wielki jak w pracach oryginalnych, ale również znaczący, co zostało adekwatnie ocenione przy ustalaniu kolejności autorstwa. Co więcej, praca przeglądowa została wydana jako pierwsza, co umożliwiło/wymusiło zapoznanie się z dostępnymi informacjami literaturowymi w przedmiocie badań i zapewne skutkowało precyzyjnym zaplanowaniem części badawczej, której wyniki opublikowano w pozostałych pracach składających się na rozprawę doktorską.

Praca jest napisana przejrzystym językiem polskim lub angielskim i czyta się ją z przyjemnością. Z obowiązku recenzenta chciałbym przypomnieć, że spójnikiem w języku polskim jest „i” a nie „and” (czwarta strona streszczenia, koniec pierwszego akapitu) białka nie składają się z aminokwasów a z reszt aminokwasowych (przedostatnia strona streszczenia). Numeracja stron, w przypadku streszczenia, byłaby pomocna. O słowo wyjaśnienia chciałbym prosić w odniesieniu do opisu miejsca cięcia łańcucha polipeptydowego przez homologu HtrA pochodzące z różnych organizmów (piąta strona streszczenia, koniec pierwszego akapitu). Pisze Pani, że HtrA_{Sm} wykazał zwiększoną preferencję do naładowanych reszt aminokwasowych w pobliżu miejsca cięcia w stosunku do ich homologów z *H. pylori* i *S. maltophilia*. Pytanie, które się nasuwa jest takie - czy w genomie *S. maltophilia* zidentyfikowano więcej niż jeden gen kodujący białko HtrA? Jeśli tak, to jakie jest podobieństwo miejsca wiążącego substrat? Jeśli nie, to opisane porównanie traci wartość. Kontynuując ten wątek chciałbym zapytać czy można skonstruować drzewo filogenetyczne homologów HtrA i czy pokrywa się ono z pozycjami systematycznymi badanych gatunków bakterii względem siebie?

Podsumowując, uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Zarzeckiej spełnia wymogi ustawowe i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę opublikowanie wyników przeprowadzonych badań wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



