



**prof. dr hab. Marcin Drąg**  
**Zakład Chemii Bioorganicznej**  
**Wydział Chemiczny**  
**Politechnika Wroclawska**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Bieleckiej**  
**pt. „Badanie specyficzności substratowej i rola deiminaz peptydyloargininowych w**  
**modulacji stanu zapalnego.”**

Deiminazy peptydyloargininowe to grupa enzymów odpowiedzialna za proces cytrulinacji, czyli przekształcania argininy w cytrulinę w substratach białkowych. Jest to ważna modyfikacja post-translacyjna wpływająca na takie procesy jak apoptoza, NEToza czy regulacja ekspresji genów. U ludzi zidentyfikowano do chwili obecnej pięć deiminaz peptydyloargininowych (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 oraz PAD6). Liczne doniesienia literaturowe w ostatnich latach wskazują na choroby takie jak łuszczyca, stwardnienie rozsiane, niektóre nowotwory, reumatoidalne zapalenie stawów, w których deiminazy peptydyloargininowe mogą odgrywać kluczową rolę. Niestety, enzymy te do chwili obecnej nie zostały jeszcze wystarczająco dobrze poznane. Jednym z takich zagadnień naukowych postanowiła zająć się w swojej pracy doktorskiej Pani mgr Ewa Bielecka. Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy.

Głównym celem pracy Doktorantki była próba otrzymania dwóch kluczowych w rozwoju chorób deiminaz peptydyloargininowych (PAD2 oraz PAD4), a następnie ich szczegółowa analiza w zakresie specyficzności substratowej, a także funkcjonalności. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie coraz liczniejszych doniesień o kluczowej roli tych enzymów w rozwoju wielu chorób uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Analiza bazy Scopus oraz Pubmed wykazuje, iż mgr Ewa Bielecka jest autorem dziesięciu prac opublikowanych w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Plos Pathogens* - 2013; *Journal of Innate Immunity*; *European Journal of Immunology*; *Journal of Immunology*; *Journal of Biological Chemistry*; *Molecular Oral Microbiology* – 2014; *Journal of Immunology* – 2015; *Journal of Biological Chemistry*; *Journal of Immunology*; *Journal of Gene Medicine* – 2016). Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem

autocytowań wynosi 153 (Scopus). Zarówno dorobek publikacyjny jak i cytowanie prac oceniam bardzo wysoko. Na szczególne podkreślenie zasługuje praca w *Journal of Biological Chemistry* z 2014 roku, w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Świadczy to o wiodącej roli w prowadzonych badaniach, a tym samym jest dowodem na kompetencje w planowaniu oraz prowadzeniu badań naukowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Ewy Bieleckiej ma klasyczny układ i liczy 143 strony. Wstęp do pracy poprzedza wykaz skrótów, który znacznie ułatwia nawigowanie w dalszych rozdziałach. Tutaj mam uwagę do Doktorantki dotyczącą braku konsekwencji w tłumaczeniu nazw związków na język polski. Większość rozwinięć skrótów jest przetłumaczona, natomiast część związków chemicznych została pominięta w tłumaczeniu (np. CFSE (ang. carboxyfluorescein succinimidyl ester); TCEP (ang. tris(2-carboxyethyl)phosphine)). Z kolei w przypadku "BAEE (ang. N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride) estrowy eter N $\alpha$ -benzoylo-L-argininy" nie jest to estrowy eter a ester etylowy. Sam wstęp do pracy liczący 38 stron jest doskonałym kompendium obecnej wiedzy na temat deiminaz peptydyloagrininowych. Ten rozdział jest napisany w bardzo przystępny i logiczny sposób, a Doktorantka dobrze dobrała literaturę źródłową. Z pewnością informacje zawarte w tym rozdziale mogą posłużyć za doskonały materiał wyjściowy do napisania pracy przeglądowej. Bardzo podoba mi się ostatnie kilka podrozdziałów, w których Doktorantka w sposób krytyczny i rzeczowy opisuje obecnie znane metody badania PAD. Moje drobne uwagi dotyczą tutaj używanych żargonów jak na przykład „profesjonalnych komórek” (s.29, prosiłbym o wyjaśnienie co ten termin znaczy), czy podwójne nazewnictwo tych samych proteaz sugerujące że mamy do czynienia z różnymi enzymami „żelatynazy, metaloproteinazy” na stronie 32 (żelatynazy – MMP2 i MMP-9 należą do rodziny metaloproteinaz). Wielokrotnie używany jest także skrót RF-HPLC, który w prawidłowym zapisie powinien brzmieć RP-HPLC (Reversed-Phase HPLC). Następnie, na jednej stronie Doktorantka przedstawiła cele swojej pracy, które jak już wspomniałem powyżej uważam za słuszne i umożliwiające udowodnienie postawionej hipotezy badawczej.

W rozdziałach Materiały (7 stron) i Metody (17 stron) Doktorantka w precyzyjny sposób przedstawiła wszystkie odczynniki oraz metody użyte w badaniach, a także organizację badań. Szeroki wachlarz zastosowanych metod pokazuje, iż Doktorantka opanowała wiele technik badawczych, a także potrafiła ich użyć do osiągnięcia celów badawczych. Wszystkie eksperymenty są przedstawione w taki sposób, iż ich powtórzenie przez niezależnego badacza wyłącznie na podstawie opisów w pracy nie byłoby problemem.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła w rozdziale liczącym 27 stron. Jest to bez wątpienia świetnie przygotowany materiał zarówno pod względem edytorskim jak i przede wszystkim potwierdzający świetne przygotowanie do wykonania i analizy danych

eksperymentalnych przez mgr Bielecką. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów są opisane rzeczowo, choć nawet tutaj Doktorantka nie wystrzegła się żargonów, takich jak „spulowano” (s.76) czy „przeinkubowany” (s.87), a nawet błędów ortograficznych (słowo „mieżąc” piszemy przez „rz”, s.98). Bardzo podoba mi się wykorzystanie klasycznych bibliotek kombinatorycznych dla proteaz do mapowania specyficzności substratowej PAD. Jest to niewątpliwie nowatorskie podejście, a otrzymane wyniki są bardzo interesujące. Mam tutaj jednak pytanie dotyczące różnic pomiędzy poszczególnymi bibliotekami. Dlaczego w bibliotece P3 użyto równomolowej mieszaniny aminokwasów w dwóch pozycjach, biblioteka P2 tylko w jednej pozycji, natomiast w bibliotece P1 wszystkie pozycje są z góry ustalone? Kolejne moje pytanie dotyczy fluorofora i wygaszacza. W użytych bibliotekach są one bezpośrednio dołączone do N- oraz C-końca fragmentu peptydowego, co jak wskazuje praktyka może znacząco zaburzyć odczyt specyficzności substratowej, przynajmniej w przypadku proteaz. W przypadku takich bibliotek zasadnym jest użycie aminokwasu „buforowego” jakim jest glicyna na obu końcach peptydu, co dramatycznie redukuje oddziaływanie fluoroforu i wygaszacza z miejscami wiążącymi enzymu. Taki układ mają na przykład substraty PAR1-4 z NovoNordisk użyte przez Doktorantkę w badaniach. Prosiłbym tutaj o szerszy komentarz. Kolejnym interesującym fragmentem jest ten dotyczący stworzenia markerów dla PAD4. Zadanie to udało się wykonać, niemniej użyte stężenia markera są znacząco wyższe w porównaniu do stosowanych standardowo w chemii biologicznej. Z czego wynikała konieczność użycia tak wysokich stężeń. Czy była to kwestia tylko słabej reaktywności grupy inhibitora? Pewne wskazówki dotyczące wyjaśnienia tego problemu można znaleźć w rozdziale podsumowującym pracę, niemniej kwestia jest na tyle ważna, iż wymaga precyzyjniejszego omówienia, gdyż może to także wyjaśnić niepowodzenie w badaniach komórkowych.

W liczącym 28 stron rozdziale Dyskusja Doktorantka w sposób wysoce merytoryczny odnosi się do wyników przeprowadzonych eksperymentów, a także sugeruje potencjalne rozwiązana napotkanych, a niezrealizowanych celów badawczych. Bardzo podoba mi się tak krytyczne, acz wyważone podejście do własnych wyników. Widać, iż mgr Bielecka bardzo dużo czasu poświęciła na opracowanie i analizę danych eksperymentalnych, a także świetnie porusza się w swojej tematyce badawczej, co dowodzi bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu. Mgr Bielecka wykazała także, iż swoją wiedzę potrafi wykorzystać w celach dydaktycznych, czego owocem była powstała pod Jej nadzorem praca licencjacka. Mój komentarz dotyczy sugerowanego rozwiązania w aspekcie struktury potencjalnie możliwych do otrzymania bibliotek kombinatorycznych. Doktorantka sugeruje, iż „Dla „biblioteki P2” w pozycji P2 znajdowałby się jeden z 19 badanych, a na pozostałych pozycjach (P3-P3’ z wyłączeniem P2) równomolowa mieszanina aminokwasów i tak dalej.

Takie podejście umożliwiłoby przygotowanie bibliotek uniwersalnych dla wszystkich badanych izoform PAD.” Analizując powyższe stwierdzenie należy rozumieć, iż w pięciu pozycjach byłyby mieszaniny równomolowe 19 aminokwasów. Gdy przemnożymy tę wartość  $19 \times 19 \times 19 \times 19 \times 19$ , daje nam to 2476099 peptydów w jednej badanej próbce. Wcześniejsze badania pokazują, iż już zastosowanie trzech pozycji z mieszaninami równomolowymi prowadzi często do dużych problemów z analizą biblioteki. Jak Doktorantka planuje rozwiązać ten problem? Bardzo proszę o komentarz Doktorantki w aspekcie proponowanego podejścia eksperymentalnego.

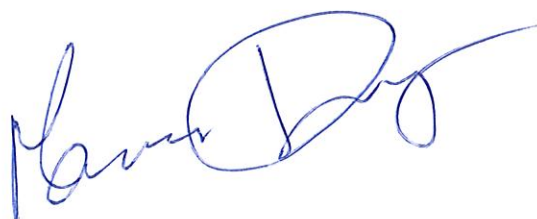
Za najważniejsze osiągnięcia naukowe opisane w pracy doktorskiej wykonanej przez mgr Bielecką uważam:

1. Wykazanie, iż PAD2 i PAD4 wykazują znaczące różnice w cytrulinacji reszt argininy w sekwencjach aktywacyjnych receptorów typu PAR.
2. Udowodnienie, iż PAD4 ma znaczący aktywność katalityczną, która umożliwia efektywną modyfikację reszt argininy w sekwencjach aktywacyjnych białek układu dopełniacza, a także ma wpływ na modyfikację kluczowych reszt argininy w komponentach układu komplementu.
3. Wykazanie, iż klasyczne biblioteki kombinatoryczne dla enzymów proteolitycznych mogą zostać wykorzystane do mapowania specyficzności deiminaz peptydyloagrininowych.
4. Otrzymanie pełnego profilu specyficzności substratowej dla PAD4 oraz częściowego profilu dla PAD2, a także wykazanie iż kwas asparaginowy w pozycji P1 jest kluczowym dla uzyskania specyficzności PAD4.
5. Opracowanie założeń strategii wykorzystania sond molekularnych (activity-based probes) dla deiminaz peptydyloagrininowych na przykładzie PAD4 i PAD2.
6. Wykazanie, iż PAD z *P. gingivalis* modyfikuje C-końcówką resztę argininy w anafilatoksynie C5a, co powoduje zmniejszenie jej aktywności biologicznej.

Cześć literaturowa pracy liczy 221 pozycji, z których bardzo dużą część stanowią prace z ostatnich lat. Doktorantka często cytuje źródłowe prace eksperymentalne, unikając cytowania prac przeglądowych, co potwierdza jej dobrą znajomość tematyki badawczej.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Bieleckiej ma nowatorski oraz oryginalny charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób wybrała metody badawcze do swoich badań,

a także osiągnęła większość założonych celów badawczych. Otrzymane wyniki z pewnością będą mogły być wykorzystane w przyszłości do dalszych badań nad poznaniem funkcji deiminaz peptydyloagrininowych. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na wysoką ocenę pracy, a jedynie mają zainspirować Doktorantkę do dalszych badań oraz do kontynuacji tej interesującej tematyki. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom prowadzonych badań naukowych oraz ich nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy mgr Ewy Bieleckiej odpowiednią nagrodą.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mariusz D.' with a large, stylized flourish at the end.