

NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



Warszawa, 28 listopada 2017

dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL

Zakład Mikrobiologii Molekularnej

Narodowy Instytut Leków

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Zuzanny Nowakowskiej „Rola fosforylacji w sekrecji gingipain i wirulencji *Porphyromonas gingivalis*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa została zaprezentowana w klasycznej formie i zawiera standardowe części publikacji naukowej, czyli Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję wraz ze spisem literatury cytowanej w tekście, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wyodrębnionymi celami pracy, wnioskami i załącznikiem przedstawiającym wyniki analizy fosfoproteomicznej. Praca zawiera również spis treści i listę użytych skrótów, bez spisu tabel i rycin.

Wstęp w zwięzły sposób wprowadza w zagadnienia dotyczące rozprawy. Autorka omawia obiekt swoich badań – *Porphyromonas gingivalis* i jego czynniki wirulencji takie jak fimbrie, LPS, otoczkę polisacharydową, PPAD, i proteazy produkowane przez ten patogen. Kolejne części wstępu omawiają system sekrecji typu IX, który jest wykorzystywany przez *P. gingivalis* do eksportu wielu elementów biorących udział w procesie wirulencji tej bakterii. Doktorantka zamieszcza też obszerną informację dotyczącą sposobów regulacji ekspresji informacji genetycznej. Autorka podeszła do tej części w sposób nieco odmienny niż zwykle. Zazwyczaj elementy systemów regulatorowych określa się mianem systemów przekazywania sygnału i omawia w kontekście przekazywania informacji/sygnału ze

środowiska zewnętrznego i uruchamiania/wygaszania ekspresji określonych genów efektorowych. Takimi wyspecjalizowanymi układami są systemy dwuskładnikowe ang. Two Component Systems – TCS, które autorka określa jako „dwuskładnikowe systemy fosforylacji”. Chyba nie do końca odpowiada mi takie określenie, wynika to jednak z mojego funkcjonalnego spojrzenia na funkcję TCS jaką jest przekazanie sygnału i regulacja aktywności cząsteczki efektorowej, a nie fosforylacja sama w sobie.

Tu mam również kolejną uwagę, wynikającą z innego spojrzenia na procesy regulacji ekspresji i przepływu informacji w komórce bakteryjnej. Autorka rozprawy określa PorX i PorY jako „sieroce” elementy, ze względu na ich fizyczne rozdzielenie w niezależne jednostki transkrypcyjne kodowane przez różne miejsca chromosomu. Muszę przyznać, że pierwszy raz zetknęłam się z takim użyciem tego określenia, które rzeczywiście występuje w niektórych publikacjach w takim kontekście. Zwykle jednak określenia „orphan regulator” czyli sierocy regulator w kontekście TCS używa się dla regulatora odpowiedzi (response regulator, RR) dla którego nie znaleziono przynależnej mu kinazy, co oczywiście sugeruje, że ta kinaza kodowana jest w innym miejscu niż RR, natomiast podkreśla również, że jest ona nieznaną. Takim sierocym regulatorem można by było nazwać RprY z *P. gingivalis*.

Ze względu na fakt, że PorXY to raczej nietypowy system dwuskładnikowy, chciałabym prosić doktorantkę, aby na podstawie działania znanych systemów przekazywania sygnału i wyników uzyskanych w swojej pracy spróbowała przedyskutować możliwość występowania innych białkowych partnerów dla PorXY, zarówno kinaz jak i regulatorów. Czy istnieją jakiegokolwiek dane, które wskazywałyby na to, że PorXY są elementami systemu typu phosphorelay, gdzie sygnał z błonowej kinazy nie jest przekazywany na czynnik transkrypcyjny, ale inne białko pośredniczące, które w sposób niebezpośredni przekazuje sygnał na białko efektorowe? Czy PorX może być takim białkiem pośredniczącym, które fosforyluje czynnik transkrypcyjny? Czy doktorantka mogłaby zasugerować eksperyment lub eksperymenty, które można by było wykonać w poszukiwaniu funkcjonalnych elementów takiego systemu?

Mam również pytanie do doktorantki o dokładniejsze przybliżenie mechanizmu w jaki PorX i PorY wpływają na regulację ekspresji genów T9SS.

Wstęp kończy omówienie metod stosowanych w modyfikacjach genetycznych *P. gingivalis*. Osoby pracujące na modelowych organizmach takich jak *Escherichia coli* K nie zawsze zdają sobie sprawę jak trudno pracuje się z bakteriami patogennymi i jak ograniczony repertuar metod jest w takich przypadkach dostępny.

I na zakończenie omawiania wstępu, mam drobna uwagę dotyczącą czynników sigma ECF. Autorka używa określenia ECF i rozwija je jako extracellular sigma factors – zewnątrzkomórkowe czynniki sigma, kiedy w rzeczywistości są to extracytoplasmic function (ECF) sigma factors.

Cel pracy jest jasno sformułowany i dotyczy wpływu systemu PorXY na aktywność i dojrzewanie gingipain oraz wykrycie mechanizmu w jaki sposób to się odbywa, oraz wykazanie wpływu PorX na wirulencję *P. gingivalis*

Kolejnym rozdziałem rozprawy są Materiały i Metody, w którym zwięźle, lecz dokładnie przedstawiono użyte metody. Na podkreślenie zasługuje długa lista konstruktów u szczepów *P. gingivalis* skonstruowanych przez doktorantkę i użytych do stworzenia szczepów *P. gingivalis* niosących różnorodne modyfikacje.

W swojej pracy doktorantka zastosowała szereg zróżnicowanych metod eksperymentalnych, począwszy od rekombinowanego DNA, włączając w to zaawansowane metody klonowania i ukierunkowanej mutagenyzy. Doktorantka wykazała się też umiejętnością zastosowania szeregu metod biochemicznych związanych z badaniem aktywności enzymów *P. gingivalis* takich jak gingipainy, PPAD czy też różne tri- i dipeptydylopeptydazy oraz innych właściwości tych białek. W skład pracy wchodzi też eksperymenty pokazujące wirulencję szczepów *P. gingivalis* w hodowlach tkankowych i modelach zwierzęcych.

Wyniki analizy fosfoproteomicznej pozwalające na identyfikację miejsc fosforylacji w białkach produkowanych przez szczep pozbawiony kinazy tyrozynowej PtK1 i fosfatazy serynowej SerB, wykonanej w laboratorium dr. Richarda Lamonta zostały zamieszczone jako załącznik. Mam w związku z tym pytanie, czy załącznik przedstawia wszystkie wykryte w tym doświadczeniu miejsca fosforylacji? Oraz czy doktorantka mogłaby bliżej przedstawić sposoby w jakie można identyfikować pulę fosforylowanych białek w komórce? Czy planowana jest być może porównawcza analiza globalnego wzoru fosforylacji WT vs mutanty Δ PorXY/ Δ PorX/ Δ PorY?

Rozdział „Wyniki” zawiera opis wykonanych eksperymentów wraz z 33 rycinami je przedstawiającymi. W trakcie swojej pracy doktorantka wykonała eksperymenty pozwalające na analizę funkcjonalną systemu PorXY i wykazanie jego roli w patogenezie *P. gingivalis*. Rozdział zawiera dokładną analizę aktywności gingipain w szczepach z usuniętym genem kodującym PorX lub PorY, w których wykazano wpływ PorX na aktywność gingipain Rgp i Kgp oraz wydzielanych w sposób niezależny od T9SS tripeptydylopeptydazy i dipeptydylopeptydaz. Następnie przy użyciu analizy western blot doktorantka badała wpływ inaktywacji elementów PorXY na proteolityczną obróbkę gingipain. W powiązaniu z obserwacją, że mutacje nie

wpływają na poziom transkrypcji gingipain, postawiono hipotezę iż różnice w obróbce gingipain mogą być spowodowane brakiem fosforylacji w mutancie Δ PorX. Aby ją potwierdzić wykonano konstrukcję szeregu mutantów PorX i PorY na drodze ukierunkowanej mutagenезy, w których zastąpiono funkcjonalne reszty aminokwasowe resztami alaniny.

W celu potwierdzenia, że wpływ PorXY na aktywność i obróbkę gingipain odbywa się poprzez fosforylację zbadano transfer reszty fosforanowej na jedną z gingipain – RgpB. W eksperymencie tym pokazano, że PorY ulega autofosforylacji a następnie przekazuje grupę fosforanową na PorX, która to fosforyluje proRgpB. W mieszaninie reakcyjnej wykryto również białko o wielkości 130kDa, które nie dość, że współoczyzcza się z PorX, to dodatkowo jest przez nie fosforylowane. Prosiłabym doktorantkę o spekulację, czym może być to nieznanne białko.

W kolejnym etapie eksperymentalnym, analizie mutacyjnej poddano gingipainy i zastąpiono zidentyfikowane przez grupę dr. Lamonta miejsca fosforylacji aminokwasami, które nie są fosforylowane i zbadano rolę fosforylacji tych aminokwasów w procesie dojrzewania enzymów.

Końcowa część wyników opisuje wpływ delekcji PorX na adhezję, inwazję i przeżywalność *P. gingivalis* w hodowlach komórkowych *in vitro* oraz na wirulencję i odpowiedź gospodarza w mysim modelu infekcji. Przeprowadzone eksperymenty wykazały wpływ PorX na wirulencję *P. gingivalis* najprawdopodobniej przez wpływ na procesy inwazji.

Uzyskane przez doktorantkę w rozdziale Wyniki są ważne i poszerzają stan wiedzy na temat wpływu systemów przekazywania sygnału ze środowiska i roli przekazywania sygnału w komórce w procesach patogenezы.

W Dyskusji doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki i w dojrzały sposób omawia je w odniesieniu do literatury. Dyskusja jest obszerna i prezentuje uzyskane wyniki w szerokim aspekcie. Zaprezentowano również model działania systemu PorXY i jego wpływu na wirulencję poprzez regulację aktywności gingipain.

Podsumowanie

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pani magister Zuzanny Nowakowskiej w powstanie rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykułе 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz

595, wraz z późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pani magister Zuzanny Nowakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Izabela Sitkiewicz

A handwritten signature in blue ink, consisting of the name 'Izabela Sitkiewicz' written in a cursive, flowing style.