



Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 5 stycznia 2018 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Dominiki Kamili Staniec zatytułowanej „Biochemiczna i strukturalna charakterystyka peptydazy cysteinowej Tpr *Porphyromonas gingivalis* W83”

Beztlenowa bakteria *Porphyromonas gingivalis* jest kluczowym patogenem odpowiedzialnym za rozwój paradontozy u człowieka. Do najważniejszych czynników wirulencji tego patogenu należą proteazy cysteinowe, odpowiedzialne za degradację licznych białek, w tym, immunoglobulin, fibronektyny, czynników dopełniacza, białek hemowych, receptorów czy inhibitorów proteaz. Szereg z tych proteaz zostało gruntownie scharakteryzowanych przez Profesora Jana Potempę, który jest uznanym autorytetem w obszarze badań nad paradontozą i bakterią *Porphyromonas gingivalis*. Praca doktorska mgr Staniec została wykonana właśnie pod Jego opieką, co zapewniło właściwe ustawienie planowanych badań i ich wysoki poziom merytoryczny.

Rozprawa doktorska mgr Staniec liczy 97 stron, jest napisana poprawną polszczyzną i podzielona jest na sześć tradycyjnych rozdziałów: *Wprowadzenie*, *Cel pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusję* i *Literaturę*. Praca jest napisana i zilustrowana starannie, zawiera jednak sporo błędów interpunkcyjnych.

Główne części rozprawy to: rozdział 1 (*Wprowadzenie*), rozdział 4 (*Wyniki*) oraz rozdział 5 (*Dyskusja*). W krótkim, liczącym 8 stron, *Wstępie* autorka przedstawia chorobę przyzębia, paradontozę, jej etiologię oraz skutki, jakie wywołuje. Następnie przedstawia bakterię *Porphyromonas gingivalis*, jako główny patogen powodujący paradontozę oraz produkowane przez nią proteazy cysteinowe gingipainy, jako najważniejszy czynnik wirulencji. Wśród innych doktorantka wymienia proteazę cysteinową Tpr, która wykazuje podobieństwo sekwencyjne do domeny katalitycznej μ -kalpainy. Choć proteaza Tpr nie jest głównym czynnikiem wirulencji, to jej podobieństwo do kalpain, nieobserwowane wśród prokariotów, zachęciły do scharakteryzowania tego enzymu, jako dodatkowego czynnika wirulencji *Porphyromonas*.

W rozdziałach *Wyniki i Dyskusja* doktorantka przedstawiła obszernie i wnikliwie omówiła uzyskane wyniki. Do najciekawszych wyników uzyskanych przez doktorantkę zaliczam:

1. Otrzymanie rekombinowanej formy proenzymu Tpr55, który degradował do krótszych form białka w obecności milimolowych stężeń Ca^{2+} . Forma o masie cząsteczkowej 33 kDa okazała się najbardziej aktywna katalitycznie, a mutacja katalitycznej cysteiny 229 do seryny prowadziła do nieaktywnego enzymu.
2. Określenie specyficzności substratowej proteazy Tpr poprzez zastosowanie bibliotek substratów użytych przez Profesora Drąga. Badania wykazały niską specyficzność dla pozycji P1 i wysoką dla pozycji P2 substratu (podobnie jak w kalpainach), z wyraźną preferencją wobec proliny.
3. Określenie struktury krystalicznej dla selenometioninowej, nieaktywnej formy proenzymu Tpr (Cys229Ser). Struktura domeny katalitycznej (reszty od Pro190 do Tyr481) przypomina katalityczną podjednostkę kalpajny, mimo tylko 22% podobieństwa sekwencji aminokwasowych. Bardzo ciekawe obserwacje wynikły z analizy struktury prodomeny (Ser11-Leu189). Jej struktura jest zbudowana z dwóch poddomen, zlokalizowanych po przeciwnych stronach centrum aktywnego enzymu. N-końcowy fragment prodomeny blokuje centrum aktywne enzymu, wiążąc się w sposób przypominający substrat i przesłaniając dostęp do niego. Przypomina to sposób inhibicji kalpajny przez jej naturalny inhibitor białkowy – kalpastatynę.
4. Porównanie mechanizmu wpływu jonów wapnia na aktywację enzymu Tpr i kalpajny. Podczas gdy mechanizm ten jest wyjaśniony strukturalnie dla kalpajny i postuluje zależne od wapnia formowanie centrum aktywnego, w przypadku białka Tpr, pomimo nieobecności jonów wapnia, w kryształach zaobserwowano aktywną formę triady katalitycznej. Brak hydrolizy wiązania Gly62-Met63 wynika przypuszczalnie z jego nieprawidłowej orientacji względem katalitycznej cysteiny. Wydaje się więc, że enzym może być aktywowany dopiero po wydzieleniu z bakterii, gdzie stężenie Ca^{2+} jest odpowiednio wysokie, aby mogło dojść do aktywacji proteazy Tpr. Doktorantka sugeruje także rolę prodomeny w zwijaniu enzymu do formy natywnej, co jest często obserwowane wśród proenzymów proteolitycznych, jednak nie przedstawia na to eksperymentalnego dowodu. Szkoda, bo byłoby to bardzo pouczającym doświadczeniem, aczkolwiek wykraczającym poza cele nakreślone w tej rozprawie.
5. Zaproponowanie, że enzym Tpr jest kolejnym istotnym czynnikiem wirulencji *Porphyromonas gingivalis*. Doktorantka pokazała, że Tpr degraduje ludzkie białka występujące w płynie nabłonka dziąseł (fibronektyna, fibrynogen). Degraduje ona też szereg innych

fizjologicznie istotnych białek, jak, składniki komplementu C3, C4 i C5, antybakteryjny peptyd LL-37 czy receptor PAR.

Skomentowane powyżej najważniejsze osiągnięcia doktoratu uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe. Oprócz tych, jakże skrótowo przedstawionych przeze mnie, głównych wyników doktoratu, w rozdziale Dyskusja znajduje się znaczna ilość wnikliwych analiz, które powodują, że doktorat czyta się jak dojrzałe opracowanie naukowe. Zresztą, część wyników rozprawy jest opublikowana.

Moje uwagi do doktoratu są nieliczne i mają charakter komentarza:

1. Osobiście nie stosuję wykresu Lineweavera-Burka, z przyczyn opisanych przez I.H. Segela w książkach *Enzyme Kinetics* czy *Biochemical Calculations*. Wykresy na rycinie 12 ilustrują problem sygnalizowany przez Segela: statystycznie nieprawidłową dystrybucję punktów eksperymentalnych.
2. W jaki sposób wyznaczano $[E_0]$ enzymu, potrzebne do wyznaczenia k_{cat} ?
3. Str. 51: II β -zgięcie (ewentualnie skręt), a nie II b-skręt.

Chciałbym zauważyć, że podczas realizacji doktoratu mgr Staniec umiejętnie posługiwała się licznymi technikami, w tym: umiejętnością produkcji czystej rekombinowanej proteazy Tpr oraz jej mutantów, standardowymi technikami analitycznymi (elektroforeza, chromatografia sprzężona ze spektrometrem mas, sekwencjonowanie białka), badaniem specyficzności substratowej proteazy z użyciem substratów syntetycznych, mapowaniem specyficzności z zastosowaniem substratów białkowych i bibliotek substratów, technikami krystalografii białka, termoforezą mikroskalową, hodowlą szczepów bakteryjnych oraz frakcjonowaniem subkomórkowym. Lista jest więc długa i zawiera zasadniczo odmienne metody, co bardzo dobrze świadczy o opanowaniu warsztatu laboratoryjnego, tak ważnego na tym etapie rozwoju.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Dominiki Kamili Staniec zatytułowanej: „Biochemiczna i strukturalna charakterystyka peptydazy cysteinowej Tpr *Porphyromonas gingivalis* W83” jest bardzo pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Płazy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową wyników uzyskanych w doktoracie oraz ich znaczenie wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

