



WYDZIAŁ CHEMII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

prof. dr hab. Adam Lesner
Kierownik Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej
Katedra Technologii Środowiska

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-523 5095
fax +48-58-523 5012
e-mail: adam.lesner@ug.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Izabeli Ciastoń
pt.: „Niezależna od aktywności proteolitycznej rola biologiczna gingipain
***Porphyromonas gingivalis* w regulacji układu odpornościowego”.**

Przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Izabeli Ciastoń dotyczy oceny wpływu nieaktywnych form proteaz pochodzenia bakteryjnego (*Porphyromonas gingivalis*) na układ odpornościowy człowieka. Wpływ wspomnianego szczepu bakterii a w szczególności ich zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych zwanych gingipainami stanowią jeden z głównych nurtów badawczych zespołu kierowanego przez prof. Jana Potempę i dr hab. Joannę Kozieł, profesor nadzwyczajną Uniwersytetu Jagiellońskiego. Bakterie te stanowią jeden z głównych składników flory przyzębia i zostały zidentyfikowane jako jeden z kluczowych czynników chorób jamy ustnej, a ostatnie doniesienia wskazują na to, że ich obecność stymuluje szereg innych chorób układowych ludzkiego organizmu. Enzymy proteolityczne wydzielane przez *Porphyromonas gingivalis* zaliczane są do głównych czynników wirulencji tej bakterii. Ich rola w tym procesie jest wieloraka i obejmuje między innymi: ułatwienie kolonizacji organizmu człowieka, przetrwanie i rozprzestrzenienie się w kolonizowanych tkankach oraz zdolność ich degradacji. Jednak podstawową funkcją gingipain jest zapewnienie bakterii substancji odżywczych, poprzez hydrolizę białek gospodarza. Wszystkie wymienione funkcje tych enzymów odnoszą się do ich form katalitycznie aktywnych, a powszechnie wiadomo, że proteazy przez część swego „cyklu życiowego” występują w postaci nieaktywnej

(zymogeny, kompleks proteaza-inhibitor oraz produkt rozpadu autokatalitycznego). To właśnie taka forma gingipain stała się przedmiotem badań mgr Izabeli Ciastoń.

Ocena formalna pracy

Praca jest dość obszerna i liczy 170 stron tekstu wraz ze spisem literatury obejmującym 268 pozycji w większości z ostatniego dziesięciolecia. Jednak część pozycji cytowanej literatury: 3,5,7,20,25,35,86,107,140,202,211,213,220,221,237,265 została zapisana w formacie, który uniemożliwia lub zdecydowanie utrudnia poprawną ich identyfikację. Spis treści rozprawy zawiera 11 wyróżnionych części choć zdaniem oceniającego brakuje tu części trzeciej, gdyż po 2. „Streszczenie” następuje 4. „Abstract”.

Rozdział zatytułowany Wstęp (liczący 45 stron) stanowi omówienie najważniejszych zagadnień wprowadzających czytelnika w tematykę rozprawy. Ten fragment rozprawy czyta się łatwo, kolorowe rysunki (łącznie 7) ułatwiają zrozumienie diskutowanych zagadnień. Kolejnym rozdziałem jest Cel pracy (w oryginale cele pracy), w którym Autorka skrótowo przedstawia główne nurty planowanych badań. Rozdział 7 Materiały i Metody zawiera opis stosowanych przez Doktorantkę odczynników oraz niezwykle szczegółowych procedur eksperymentalnych, pozwalających odtworzyć lub powtórzyć prowadzone przez mgr Ciastoń badania. Poza początkowym fragmentem zawierającym tabele oraz znaczną ilość nieścisłości i niekonsekwencji w nich zawartych ta część rozprawy bez wątpienia zasługuje na wyróżnienie. Chciałbym zwrócić uwagę na szeroki wachlarz prowadzonych przez Nią często niełatwych eksperymentów wymagających dużej wprawy i doświadczenia. Rozdział 8 Wyniki stanowi obszerny opis uzyskanych rezultatów badań nad ustaleniem roli nieaktywnych form enzymów proteolitycznych (głównie RgpA) na stymulacje układu odpornościowego gospodarza w modelu komórkowym (komórki dendryczne, fibrobalsty dziąsłowe). Wyniki prezentowane są na szeregu rycin oraz zdjęć co znacznie ułatwia ich zrozumienie i interpretację. Kolejny rozdział 9 Dyskusja stanowi zwarty tekst zakończony trzema rysunkami podsumowującymi funkcje nieaktywnych katalitycznie gingipain w procesie stymulacji odpowiedzi immunologicznej. Wnioski końcowe (rozdział 10) kończą merytoryczną część rozprawy.

Podsumowując stronę formalną rozprawy doktorskiej należy podkreślić fakt, że napisana jest językiem naukowym z niewielką ilością zapożyczeń z języka angielskiego (str. 41 akapit 1) i błędów edytorskich: inhibitotów (podpisy na rysunkach 30, 31). Recenzent chętnie się dowie co Autorka rozumie pod pojęciem „profesjonalny fagocyt” i czy występuje też jego nieprofesjonalna odmiana? Sformułowanie to na pewno ma swój zamiennik w języku

polskim. Zdaniem recenzenta sformułowania „autoimmunologiczna choroba” czy „drobnocząsteczkowe inhibitory” są nie poprawne. Mostki disiarczkowe (str. 73) nie występują w białkach, lecz w układach nieorganicznych, połączenia dwóch grup sulfhydrylowych nazywamy mostkami disulfidowymi.

Ocena części merytorycznej

Prace prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, ich poziom i otrzymane wyniki zasługują na wyróżnienie. Poznanie roli nieaktywnych katalitycznie gingipain (w tym szczególnie RgpA) w procesie indukcji odpowiedzi immunologicznej jest zagadnieniem nowym i bez wątpienia prowadzi do powstania nowej wiedzy w zakresie immunologii. Na wyróżnienie zasługuje też identyfikacja szlaku aktywacji, który ulega pobudzeniu pod wpływem ginginapin.

W procesie poszukiwania partnerów komórkowych RgpA osobiście powstrzymywałbym się ze stawianiem zbyt daleko idących hipotez, czy też wniosków wysnutych na podstawie danych z sieciowania chemicznego. W mojej opinii technika ta obarczona jest wieloma wadami i należy ją traktować z dużą ostrożnością jako komplementarną do innej wiodącej, takiej jak w przypadku ocenianych badań - immunoprecypitacji. Identyfikacja poszczególnych partnerów komórkowych nieaktywnej formy RgpA już sama w sobie stanowi sukces, lecz ze względu na dużą ilość wyników potencjalnie fałszywie dodatnich wymagana jest weryfikacja innymi metodami (SPR, termoforeza, ITC).

Podczas lektury części eksperymentalnej oraz dwóch kolejnych rozdziałów rodzi się kilka pytań, na które chciałbym usłyszeć odpowiedź w trakcie obrony rozprawy doktorskiej:

1. Jaka jest struktura inhibitorów z grupy KYT oraz jaki jest ich mechanizm hamowania ginginapin ?
2. Czy w trakcie oceny wpływu indukcji IL-6 i innych cytokin przez nieaktywne formy gingipain Doktorantka stosowała inaktywowane termicznie formy tych enzymów? Czy poszerzenie badań o zymogeny tych enzymów nie byłoby korzystne w tym kontekście? Jak zahamowanie aktywności gingipain przez inny typ inhibitora (o nieodwracalnym mechanizmie inaktywacji) wpłynie na indukcję odpowiedzi prozapalnej?
3. Widomo, że aktywne formy gingipainy są zdolne do trawienia cytokin w tym IL-6. Czy ten mechanizm wygaszenia odpowiedzi immunologicznej sprzyja kolonizacji przyzębia przez *Porphyromonas gingivalis* czy raczej stanowi on przeszkodę w tym procesie?

Podsumowując rozprawa doktorska mgr Izabeli Ciastoń dotyczy istotnego problemu naukowego z zakresu immunologii. Doktorantka podjęła się szeroko zakrojonych badań charakteryzujących rolę czynników wirulencji bakterii przyzębia (*Porphyromonas gingivalis*) a w szczególności roli nieaktywnych form proteaz bakteryjnych w odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W swojej rozprawie zaprezentowała interesujące i ważne z naukowego punktu widzenia wyniki, wykazała się umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z przeprowadzonych badań. Chciałbym podkreślić, że wszystkie przedstawione uwagi i komentarze w żaden sposób nie obniżają wysokiego poziomu niniejszej rozprawy, a stanowią jedynie przyczynek do dyskusji naukowej, której finał usłyszymy na obronie rozprawy. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Izabeli Ciastoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adam Lesni

Gdańsk 29-05-2018