

Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 07.01.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Unikalny mechanizm aktywacji proteiny SplB gronkowca złocistego”

przedstawionej przez magistra Michała Zdżalika

Praca doktorska mgr Michała Zdżalika podejmuje analizę mechanistycznych aspektów katalizy gronkowcowych proteinaz serynowych z rodziny chymotrypsyny. Mogłoby się wydawać, iż tematyka ta jest już mocno wyeksploatowana – proteiny z tej rodziny stanowią modelowe białka w badaniach katalizy enzymatycznej (trypsyna, chymotrypsyna), a liczba opublikowanych badań analizujących szczegóły mechanizmu katalizy tych enzymów na poziomie atomowym jest ogromna. Okazuje się jednak, iż doktorant nie bez rozmysłu podejmuje właśnie tą tematykę. Wstępne prace przeprowadzone przez współpracowników i samego doktoranta wskazują, iż istotne szczegóły procesu aktywacji i mechanizmu katalizy proteinaz Spl odbiegają od modelu kanonicznego. Co więcej, niektóre obserwacje wydają się być wprost sprzeczne z przyjętym i doskonale zweryfikowanym wieloletnimi badaniami nad innymi przedstawicielami tej rodziny modelem. Chęć rozwikłania tych zagadek i wyjaśnienia pozornych (lub realnych) niespójności jest motorem prowadzonych przez doktoranta prac opisanych w rozprawie.

Rozprawa obejmuje dwa wątki tematyczne: (i) analizę roli precyzyjnego formowania N-końca enzymu w kontroli aktywności proteolitycznej – wyniki tych badań zostały w całości opublikowane, oraz (ii) analizę niekanonicznej konformacji miejsca wiązania oksyanionu – dane te, stanowiące większą objętościowo i co do zakresu badań część rozprawy nie zostały dotychczas opublikowane.

(i) Zauważono, iż nieprecyzyjne formowanie N-końca enzymu, czy to przez obecność peptydu sygnałowego, czy innych modyfikacji, wprowadzonych sztucznie w systemie rekombinowanej ekspresji, obniża zdolności katalityczne enzymu. Obserwacja ta nie jest nieoczekiwana w świetle danych literaturowych – mechanizm aktywacji proteinaz trypsynopodobnych obejmuje właśnie precyzyjne kształtowanie N-końca. Jednak badania strukturalne przeprowadzone przez doktoranta wskazują, iż mechanizm tego procesu na poziomie atomowym jest zupełnie inny w przypadku proteinaz Spl. Dalsze badania doktoranta skupiają się na charakterystyce molekularnej nowego mechanizmu. Analiza strukturalna, w połączeniu z

mutagenezą punktową oraz precyzyjnymi badaniami kinetyki enzymatycznej pozwalają na stworzenie spójnego obrazu mechaniki procesu aktywacji SplB na poziomie atomowym.

(ii) Główną część prac przedstawionych w rozprawie doktorskiej stanowi analiza pozornej sprzeczności między założeniami kanonicznego modelu mechanizmu katalizy proteinaz serynowych rodziny chymotrypsyny, a szczegółami strukturalnymi obserwowanymi w przypadku proteiny SplB. Istotną rolę w mechanizmie kanonicznym pełni miejsce wiązania oksyanionu, które nie jest wykształcone w strukturze SplB. Taka obserwacja sugeruje niezdolność katalizy reakcji proteolizy przez to białko, co jednak jest sprzeczne z obserwacjami eksperymentalnymi – SplB jest aktywnym enzymem proteolitycznym. By wyjaśnić tę sprzeczność doktorant podejmuje krytyczną analizę wstępnych obserwacji dotyczących SplB. Analiza ta potwierdza jednak wcześniejsze obserwacje. Na dalszym etapie doktorant w serii interesujących eksperymentów wykazuje, iż kanoniczna konformacja miejsca wiązania oksyanionu jest indukowana przez wiązanie substratu (właściwie inhibitora stanowiącego analog substratu, a więc najprawdopodobniej także i substratu; W tym miejscu nasuwa się pytanie jakie eksperymenty można by przeprowadzić by wykazać wprost, iż analogiczne zmiany konformacyjne w miejscu wiązania oksyanionu zachodzą podczas procesu katalizy?), co tłumaczy pozorną sprzeczność między niekanoniczną konformacją istotnego dla katalizy fragmentu enzymu i zdolnością katalityczną tego białka. Na podstawie uzyskanych danych doktorant przedstawia bardzo przejrzysty i przekonujący model dynamicznych zmian strukturalnych zachodzących w centrum aktywnym proteinaz Spl podczas katalizy, a więc indukowane substratem „otwarcie” miejsca wiązania oksyanionu i ponowne jego „zamknięcie” po zakończeniu hydrolizy pojedynczej cząsteczki substratu.

Rozprawę oceniam jako bardzo ciekawą. Cele pracy są precyzyjnie określone i konsekwentnie realizowane. Doktorant stosuje odpowiednio dobrany i stosunkowo szeroki wachlarz metod. Podejmuje skomplikowane wyzwanie i wywiązuje się doskonale z jego analizy. Potrafi krytycznie kontrastować swoje obserwacje z danymi literaturowymi i nie boi się wyciągać i weryfikować wniosków sprzecznych z wiedzą kanoniczną dążąc do spójnego wyjaśnienia problemu, a nie tylko przyczynkowych obserwacji. Rozprawa stanowi kompletny i zamknięty obraz analizy podejmowanych problemów, a wnioski z tej analizy tłumaczą w sposób satysfakcjonujący podejmowane zagadnienia badawcze.

Wysoka ocena wartości naukowej rozprawy idzie w parze z wysoką oceną strony redakcyjnej. Swoje pozytywne uwagi i pewne drobne zastrzeżenia w tym zakresie przedstawiam poniżej.

Rozprawa doktorska magistra Zdźalika ma układ klasyczny przyjęty dla tego typu opracowań, choć w porównaniu z wieloma z nich prezentacja jest stosunkowo zwięzła. Powyższa zwięzłość stanowi ważną zaletę pracy. Praca zawiera dużą ilość różnorodnych i ciekawych wyników, które zostają przedstawione w sposób dokładnie wystarczający – ani nazbyt lakoniczny ani nazbyt szczegółowy i rozbudowany. Zasygnalizowane jest jedynie to co niezbędne, to co ilustruje sedno przeprowadzonego eksperymentu i jego wyniku, nie pozostawiając jednocześnie wątpliwości, iż doktorant nie rozbudowuje nadmiernie tematu nie z braku

wiedzy, ale właśnie dlatego, iż wiedzę tę doskonale opanował i umie ją przekształcić i przedstawić w sposób zrozumiały i spójny.

We wstępie doktorant skupia się na szczegółowej charakterystyce wybranych enzymów proteolitycznych gronkowca złocistego i szczegółów mechanizmu katalizy. Jest to jak najbardziej adekwatne do tematyki podejmowanej w rozprawie, a treść tych rozdziałów została starannie przemyślana i klarownie przedstawiona, przez co bardzo dobrze przygotowuje do lektury dalszej części rozprawy. W moim jednak odczuciu brakuje tu szerszego wstępu na temat fizjologii i roli gronkowca w patogenezie. Uwaga ta nie oznacza by wstęp był niewystarczający jako wprowadzenie do podejmowanej tematyki albo by zawarte w nim informacje były niewystarczające do zrozumienia dalszej części rozprawy. Wręcz przeciwnie – doktorant przedstawia szczegółowo całościowy „stan nauki” w podejmowanym temacie i podaje wszelkie szczegóły niezbędne do zrozumienia prezentowanych dalej badań i wyników w świetle stanu wiedzy. Niemniej, szerszy wstęp, obejmujący ogólny ogląd stanu wiedzy na temat badanego organizmu, jego patogenezy i mechanizmów molekularnych tego procesu byłby wskazany dla tego typu opracowania, kierowanego do szerokiej grupy naukowców a nie jedynie do specjalistów w bardzo wąskiej dziedzinie enzymów proteolitycznych. Ciekawy, szeroki wstęp pozwala zbudować większe zainteresowanie tematyką, umiejscowić ją na mapie współczesnej nauki, tym samym zachęcając czytelnika do zgłębienia podanej dalej wiedzy szczegółowej i nie powinien być pomijany nawet w opracowaniach specjalistycznych – szczególnie, iż autor niewątpliwie posiada szerszą wiedzę, która pozwoliłaby na przygotowanie takiego wstępu, na co wskazuje lektura jego prac naukowych.

Rozdział „Materiały i metody” został przygotowany na wzór podobnych rozdziałów prac naukowych. Odbiega to od tradycyjnego sposobu przygotowania prac doktorskich gdzie rozdziały dotyczące metodologii są zwykle bardzo rozbudowane i szczegółowe. Nie jest to jednak zarzut, a wręcz przeciwnie. Prace doktorskie, jeśli tylko nie są pracami ściśle metodologicznymi, powinny, tak jak inne prace naukowe, skupiać się na omówieniu wyników, ograniczając opis procedur eksperymentalnych, szczególnie tych rutynowych, do niezbędnego minimum.

Doktorant jasno i zwięźle zdefiniował cele swojej pracy przed rozpoczęciem omawiania wyników. Rozdział dotyczący wyników jest przejrzysty i ilustrowany bardzo starannie przygotowanym materiałem graficznym, jak przystało na wysokiej jakości publikację strukturalną, która to metodologia jest stosowana przez autora najszerzej. Dane przedstawione są przejrzyste, bez nadinterpretacji, nadmiernej szczegółowości, niedostatecznej precyzji – dokładnie w sposób przyjęty dla dobrych publikacji specjalistycznych, co świadczy o dojrzałości naukowej autora opracowania.

Na uznanie zasługuje sposób prowadzenia dyskusji wyników. Zwraca uwagę precyzja sformułowań i odpowiednia doza ostrożności w interpretacji obserwacji, co świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta. Dyskusja jest poprowadzona w sposób interesujący, nie powtarza nadmiernie opisu wyników, a raczej systematyzuje je i tłumaczy ich znaczenie na tle stanu wiedzy. Ponownie, jak w poprzednich częściach pracy, aspekty strukturalne są ilustrowane przejrzystą i interesującą wizualnie grafiką. Konkluzje są wyważone,

dobrze poparte materiałem eksperymentalnym i odnoszą się w sposób adekwatny i krytyczny do zastanego stanu wiedzy.

Bibliografia pracy jest bogata ale jednocześnie nie nadmiernie rozbudowana i obejmuje odwołania zarówno do literatury dawniejszej, jak i najnowszej, co pokazuje iż doktorant wykazuje się dobrą znajomością literatury, którą umie odpowiednio dobrać dla zilustrowania zagadnień prezentowanych i dyskutowanych w rozprawie.

Pewne nieliczne i niewielkie mankamenty dostrzeżone w pracy nie umniejszają w żaden sposób wartości rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Zdżalika jest spójna merytorycznie i ciekawa, a przedstawione wyniki wnoszą nową wartość do bieżącego stanu wiedzy. Rozprawę czyta się bardzo dobrze. Tekst jest przygotowany klarownie. Nie budzi zastrzeżeń sposób prezentacji wyników – dobór rysunków, tabel, jak i ich czytelność. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny, z zastosowaniem właściwej metodologii badawczej, a autor wykazał się inwencją w rozwiązywaniu napotkanych problemów. Uzyskane wyniki zostały poprawnie zinterpretowane technicznie oraz właściwie skontrastowane ze stanem wiedzy. Wnioski wyciągnięte przez autora są wyważone, brak w nich nadmiernej przesady i nadinterpretacji.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż dorobek doktoranta obejmuje 11 prac naukowych w tym trzy prace pierwszoautorskie i dwie dalsze w których doktorant jest drugim autorem. Wyników zawartych w tych pracach wystarczyłoby z pewnością na przygotowanie wartościowego doktoratu, a jednak doktorant decyduje się pójść jeszcze dalej i przedstawić doktorat oparty w większości na nowych, nieopublikowanych jeszcze wynikach, co łącznie stanowi dorobek naprawdę imponujący na tym etapie kariery naukowej.

Z przedstawionych wyżej powodów stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Zdżalika odpowiada zawiązką wszelkim warunkom stawianym pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Dorobek naukowy doktoranta i jego dojrzałość naukowa w pełni uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora. W związku z tym **wnioskuje o dopuszczenie mgr Michała Zdżalika do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie, z uwagi na wysoką ocenę rozprawy doktorskiej jak i całokształtu dorobku naukowego magistra Zdżalika **wnoszę o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej**.

dr hab. Elżbieta Jankowska

