



Prof. dr hab. Teresa Olczak
Tel. 71 3752 612
E-mail: Teresa.Olczak@biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 7.01.2015 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mirosława Książka pt. „Charakterystyka proteazy i serpiny *Tannerella forsythia*”

Rozprawa doktorska mgr Mirosława Książka to dwie publikacje naukowe, w których Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym oraz dorobek Doktoranta w postaci prac opublikowanych we współpracy z innymi autorami. Całość rozprawy doktorskiej została opatrzona autoreferatem wprowadzającym w temat pracy podjęty przez Doktoranta. Praca doktorska została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy. Promotor Doktoranta oraz członkowie Zakładu Mikrobiologii, kierowanego przez prof. Potempę, od wielu lat zajmują się badaniem podstaw chorób przyzębia. Poprzez realizację pracy doktorskiej, Doktorant znacznie przyczynił się do zwiększenia osiągnięć naukowych tej grupy badawczej. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktoranta dotyczy jednego z ważnych aspektów zdrowia człowieka, gdyż choroby przyzębia zaliczane są obecnie do powszechnych chorób infekcyjnych, mających wpływ nie tylko na stan jamy ustnej, ale także na ogólny stan zdrowia. Biorąc pod uwagę znaczenie chorób przyzębia także w rozwoju schorzeń układowych, nasilającą się oporność na stosowane antybiotyki, a także wzrastające koszty leczenia, charakterystyka podstawowych mechanizmów bakteryjnej wirulencji, wykorzystywanych przez patogeny jamy ustnej, należy do ważnych aspektów nauk medycznych oraz ochrony zdrowia.

W przewlekłe choroby przyzębia zaangażowane są bakterie żyjące w postaci wielobakteryjnego biofilmu, zwłaszcza bakterie należące do tzw. „czerwonego kompleksu”, czyli *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*. Obiektem badań Doktoranta były bakterie *T. forsythia*, czyli gatunek dość słabo do tej pory poznany. Efektem pracy doktorskiej jest charakterystyka dwóch nowych białek: proteazy serynowej, mirolazy oraz inhibitora proteaz należącego do serpin, miropiny. Cele pracy doktorskiej zostały zasadniczo zrealizowane. Doktorant zweryfikował sekwencje kodujące mirolazę i miropinę, szczegółowo scharakteryzował te dwa białka pod względem biochemicznym, wykazał ich wzajemne oddziaływanie, zaproponował lokalizację oraz potencjalne funkcje biologiczne. Natomiast wydaje się, że cele polegające na określeniu poziomu ekspresji tych białek oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja nie są jeszcze do końca zrealizowane. Recenzent jest jednak pewny, że w najbliższym czasie ukażą się kolejne doniesienia, uzupełniające już opublikowane prace. Aby dopełnić niedosyt dyskusji, Recenzent prosi o bardziej szczegółowy opis takich badań.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki są nowe nie tylko ze względu na odkrycie tych białek w bakteriach *T. forsythia*, ale przede wszystkim ze względu na ich właściwości, odmienne w porównaniu z typowymi białkami należącymi do tych grup i być może dlatego wykorzystywane w specyficzny sposób przez bakterie *T. forsythia*. Doktorant udowodnił, że mirolaza wykazuje nowy, unikalny mechanizm aktywacji poprzez sekwencyjną autoproteolizę, a miropina zdolność do hamowania aktywności wielu proteaz o różnej specyficzności, z wytworzeniem kowalencyjnych kompleksów oraz rozpoznawaniem przez proteazy różnych pozycji w obrębie pętli reaktywnej miropiny. Ciekawy jest także fakt, że miropina ma zdolność do hamowania endogennej mirolazy, ale tylko w postaci promirolazy. Doktorant proponuje także biologiczne substraty dla tych białek i zakłada, że obydwa białka

mogą przyczyniać się do patogenności bakterii *T. forsythia*. O ile proteolityczna aktywność mirolazy wobec fibrynogenu i peptydu antybakteryjnego LL-37 jest dobrze udokumentowana, o tyle wpływ mirolazy na hemoglobinę wydaje się już bardziej kontrowersyjny, gdyż na Rys. 5 w pracy opublikowanej w *Biological Chemistry* praktycznie nie widać skutków sugerowanej proteolizy. Recenzent domyśla się, że hemoglobina zakupiona w firmie Sigma była stosowana w postaci methemoglobiny, co powinno zasadniczo ułatwić proces trawienia, ale nie jest to zaznaczone w opublikowanej pracy i dlatego też prosi o krótkie wyjaśnienie ewentualnego znaczenia rodzaju hemoglobiny na podatność na proteolizę oraz odniesienie się do ewentualnych różnic w działaniu mirolazy w porównaniu z działaniem proteolitycznym na hemoglobinę innych bakteryjnych enzymów, w tym gingipain. Z wyjątkiem wyżej wymienionych wątpliwości, recenzent nie ma zastrzeżeń do uzyskanych wyników oraz ich interpretacji. W pracy doktorskiej przedstawione są także wstępne propozycje funkcji tych białek poprzez ich wykorzystanie do przeżycia bakterii *T. forsythia* w wielobakteryjnym biofilmie jamy ustnej, składającym się z bakterii produkujących wiele enzymów proteolitycznych oraz nasilenia wirulencji tych bakterii wobec komórek gospodarza. Na uwagę zasługuje także udział Doktoranta w wielu innych, opublikowanych już pracach wraz z innymi autorami, dotyczących m.in. charakterystyki nowej metaloproteazy z bakterii *T. forsythia*, karilizyny, a także opisu nowego bakteryjnego systemu sekrecji gingipain bakterii *P. gingivalis*.

Na podstawie przedstawionych dwóch prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej, a także udziału Doktoranta w innych pracach, Recenzent wnioskuje, że mgr Mirosław Książek do realizacji prowadzonych badań wykorzystał szeroki wachlarz nowoczesnych metod badawczych, dobrze dobranych do rozwiązania postawionych problemów badawczych. Wszystkie prace zawierają wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna większość to wyniki nowe, wnoszące istotny wkład nie tylko w dziedzinę charakterystyki patogenezы chorób przyzębia, ale także w ogólnie pojętą dziedzinę biochemii białek. Uzyskane wyniki są interesujące nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych, ale mogą one także dostarczyć informacji dla badaczy poszukujących nowych celów do opracowania w przyszłości nowej generacji metod antybakteryjnych, stosowanych w zapobieganiu i leczeniu chorób przyzębia. Zdaniem Recenzenta najbardziej istotne jest właśnie uzyskanych nowych wyników, wnoszących istotny wkład w naukę, a w znacznie mniejszym stopniu ich ocena parametryczna. Jednakże w tym przypadku uzyskane wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrych i renomowanych czasopismach, o całkowitym współczynniku oddziaływania ponad 30, co istotnie zwiększa wartość pracy doktorskiej.

Ocena rozprawy doktorskiej w formie przedstawionej przez Doktoranta z jednej strony jest prostsza w porównaniu z tradycyjną formą prac doktorskich, bo nie trzeba rozpatrywać wyników opisanych na wielu stronach pracy doktorskiej. Pewnym ułatwieniem jest także zapoznanie się z opublikowanymi pracami, które zostały już pozytywnie ocenione przez innych recenzentów, co w dużej części właściwie zwalnia Recenzenta od ich szczegółowej oceny. Zdaniem Recenzenta jednak pewnym utrudnieniem jest właśnie brak opisu wszystkich wyników uzyskanych przez Doktoranta z jego własnym, szerokim uzasadnieniem oraz dyskusją. Autoreferat jedynie streszcza i bardzo ogólnie przedstawia osiągnięcia naukowe, a w rozprawie doktorskiej brakuje szczegółowego wykazania zakresu prac wykonanych przez Doktoranta, zarówno w zestawie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jak też w pozostałych pracach. Dlatego też, Recenzent prosi o wyjaśnienia i krótką dyskusję na temat nieściśłości wykazanych w tej recenzji.

Autoreferat przedstawiający osiągnięcia Doktoranta jest napisany poprawnie pod względem merytorycznym. Pewne nieściśłości jednak przedstawiono m.in. podczas opisu analizy ekspresji genów badanych białek. Doktorant pisze na str. 12 „Przed przystąpieniem do dalszych prac sprawdzono czy oba białka są produkowane przez szczep laboratoryjny *T.*

forsythia. W tym celu wykorzystano PCR w czasie rzeczywistym, a za poziom odniesienia wybraliśmy poziom ekspresji karilizyny (Figura 2, wyniki nieopublikowane). Oba białka są ekspresjonowane przez szczep laboratoryjny *T. forsythia*, a poziom ekspresji miropiny jest ponad 20 razy większy od poziomu ekspresji mirolazy." Zdaniem Recenzenta nie są to poprawne stwierdzenia i prosi Doktoranta o ustosunkowanie się do tego podczas dyskusji. Wydaje się także, że zwrot użyty na str. 13 nie jest poprawnie przedstawiony: „Inkubacja oczyszczonego kompleksu NTP z CD przez 24 h w 37°C prowadziła do stopniowej degradacji NTP, aż do uzyskania przez enzym pełnej aktywności mierzonej na substracie Azocoll.” Z poczucia obowiązku Recenzent wykazuje także niedociągnięcia dotyczące sposobu pisania tego typu tekstów w języku polskim. Błędy wynikające z dosłownego tłumaczenia niektórych zwrotów angielskich oraz pewna niechlujność w przedstawianiu tak przecież cennych osiągnięć wpływają niekorzystnie na czytającego, zwłaszcza, że może nim być student rozpoczynający pracę badawczą. Czytającego razi np. używanie zwrotu „Figura” do określenia pojęć „Rysunek” lub „Rycina”, stosowanie jednostek przedstawionych w postaci „h”, a oznaczających „godziny”, wstawiania litery „X” zamiast symbolu „x”. Nie są to oczywiście bardzo częste błędy i Recenzent nie wymaga biegłej znajomości języka polskiego, a jedynie zwraca uwagę na błędy i zaniedbania głównie z powodów dydaktycznych. Niestety część błędów jest także powielana w pracach angielskojęzycznych, wysłanych do redakcji czasopism i zaakceptowanych do druku. Bardziej rozsądne sprawdzanie tekstów przygotowywanych do publikacji jest tym ważniejsze, że doktorant jest już autorem korespondencyjnym. Prace będące podstawą rozprawy doktorskiej są przedstawione w postaci tzw. "szczotki" i często trudno jest wywnioskować o wprowadzonych zmianach, np. w miejsce skreślonych słów i zwrotów nie są widoczne wprowadzone w tekście zmiany, a niektóre drobne błędy pozostały nadal niezmienione. Recenzent ma oczywiście do dyspozycji już bardziej aktualne wersje publikacji znajdujące się w bazach danych, z których korzysta, ale nie zmienia to faktu, że materiał przedstawiony w rozprawie doktorskiej powinien być kompletny. Są to oczywiście drobiazgi, które absolutnie nie wpływają na wartość rozprawy doktorskiej, ale Recenzent ma nadzieję, że będą one uwzględnione przez młodego naukowca w pracach pisanych w przyszłości.

Podsumowując, dorobek naukowy mgr Mirosława Książka przedstawiony w rozprawie doktorskiej oraz opublikowany w pozostałych pracach oceniam bardzo wysoko. Uzyskane samodzielnie lub we współpracy wyniki są niezwykle cenne, przede wszystkim ze względu na to, że są to nowe dane naukowe, wnoszące do nauki charakterystykę nowych białek i procesów biochemicznych. Recenzent podkreśla nie tylko szeroki warsztat badawczy wykorzystywany przez Doktoranta, ale przede wszystkim osiągnięcie nowych i interesujących wyników, co jest wymogiem, który powinien być spełniony w każdej pracy doktorskiej. Na uwagę zasługuje także duża samodzielność Doktoranta, przejawiająca się w jego wszechstronności, udziale w licznych projektach oraz odpowiedzialności za wyniki poprzez pozycję autora korespondencyjnego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska oraz dorobek mgr Mirosława Książka pod względem naukowym spełniają wszelkie zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Dlatego też, z ogromną przyjemnością wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową prac badawczych wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Mirosława Książka stosowną nagrodą.

Teresa Olczak