



Wrocław, 5 stycznia 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Karoliny Płazy zatytułowanej:

„Wpływ gingipain, cysteinowych proteaz produkowanych przez *Porphyromonas gingivalis* na zaburzenie funkcji ochronnych nabłonka dróg oddechowych. Identyfikacja potencjalnych mechanizmów wirulencji patogenu w kontekście wywoływanego zachłystowego zapalenia płuc”

Jednym z najnowszych trendów we współczesnej biologii jest ustalanie podstaw molekularnych chorób człowieka w celu opracowania nowych metod ich zwalczania. W nurt ten wpisuje się rozprawa doktorska mgr Karoliny Płazy, która dotyczy analizy mechanizmów molekularnych prowadzących do zachłystowego zapalenia płuc, związanego z powodującymi paradontozę bakteriami *Porphyromonas gingivalis*. Praca została wykonana pod opieką Profesora Jana Potempy, który jest znakomitym specjalistą w podjętej przez doktorantkę tematyce badawczej. Tak więc, pod względem tematyki badawczej temat jest aktualny, a realizacja jego w laboratorium promotora zapewniła dostęp do wszelkich niezbędnych metod i prawidłowego ustawienia planu badań.

Rozprawa doktorska mgr Płazy to napisany po polsku maszynopis liczący 136 stron i podzielony na 11 rozdziałów. Układ pracy nie odbiega od tradycyjnego podziału na *Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie, Summary, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Bibliografię* i *Podsumowanie*. Praca jest napisana i zilustrowana starannie, zawiera jednak pewną liczbę błędów interpunkcyjnych i tzw. literówek. Na poziomie redakcji pracy doktorskiej mam następujące zastrzeżenia:

- szereg akapitów jest stanowczo zbyt długich (np. akapit na stronach 19-22 liczący niemal 3 strony), co utrudnia lekturę doktoratu;
- w rozdziale *Wyniki* brakuje wyodrębnienia podrozdziałów.

Główne części rozprawy to: rozdział 5 (*Wstęp*), rozdział 9 (*Wyniki*) oraz rozdział 10 (*Dyskusja*). W obszernym *Wstępie*, liczącym 26 stron, autorka przedstawia wszystkie zagadnienia, które są przydatne dla zrozumienia doktoratu: zachłystowe zapalenie płuc, bakterie *Porphyromonas gingivalis* oraz produkowane przez nie proteazy gingipainy.

Następnie doktorantka opisuje enzymy metaloproteazy MMP, ich tkankowe inhibitory TIMP, a także kallikreiny i ich inhibitory, białko płucnego surfaktanta SP-A oraz kalgranuliny S100A8 i S100A9. Informacje o tych białkach są istotne, gdyż są one przedmiotem badań opisanych w dalszej części pracy. Rozdział napisany jest bardzo kompetentnie, jasno i dobrze wprowadza w różne aspekty rozprawy doktorskiej.

Podobnie wyczerpująco zostały napisane rozdziały *Materiały* i *Metody*. Rozdział *Metody* zawiera aż 46 podrozdziałów opisujących szczegółowo wszelkie techniki biologii molekularnej, ekspresji białek w bakteriach i drożdżach, ich oczyszczania, analizy i sekwencjonowania. Opanowanie różnorodnych metod badawczych, obok uzyskania wartościowych wyników, jest jednym z zasadniczych celów stawianych pracom doktorskim. Rozdział ten dobitnie świadczy o ogromnej pracy doświadczalnej, jaką wykonała doktorantka w ramach tego doktoratu.

W rozdziale *Wyniki* mgr Płaza przedstawiła obszernie i wnikliwie omówiła uzyskane wyniki. Do najciekawszych wyników uzyskanych przez doktorantkę zaliczam:

1. Pokazanie w eksperymencie *in vivo*, że infekcja myszy bakteriami *P. gingivalis* prowadzi do znacznego uszkodzenia ich płuc. Efekt uszkodzenia płuc obserwowano jedynie w przypadku dzikiego szczepu tych bakterii, nie zaś w przypadku potrójnego mutantu delecyjnego gingipain KRAB. Wynik ten jasno potwierdza wcześniejsze doniesienia o związku między stadium zaawansowania paradontozy a rozwojem zachłystowego zapalenia płuc. Doktorantka omawiając ten wynik sugeruje, że zmiany degradacyjne w płucach myszy są tak duże, że mogą być wywołane nie tylko proteazami (gingipainami) produkowanymi przez te bakterie, ale wynikać także z aktywacji przez proteazy bakteryjne metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej i kallikrein, jak również z degradacji przez te proteazy naturalnych inhibitorów proteaz gospodarza. Ta hipoteza była szczegółowo badana w dalszych częściach pracy.
2. Opracowanie systemu CleavEx umożliwiającego identyfikację miejsc hydrolizy w białkach (w tym przypadku w wymienionych powyżej proteaz i ich inhibitorów). Metoda CleavEx omija problem produkcji i optymalizacji procesu zwijania tych białek, jest też prosta i wydajna. Opiera się ona na utworzeniu konstruktów białkowych, w którym badana sekwencja, zbudowana z 10-11 reszt aminokwasowych, prezentowana jest na stabilnym, rozpuszczalnym i odpornym na proteolizę białku. Doktorantka przetestowała kilka potencjalnych białek (S-transferazę glutationu i domenę CTD gingipainy), ale obie

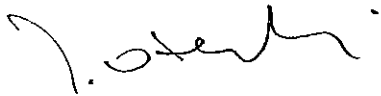
okazały się być wrażliwe na działanie gingipain. Ostatecznie wybrała białko HmuY, które okazało się odporne na działanie gingipain i trypsyny, a ponadto wydajnie produkowane i łatwe w oczyszczeniu, dzięki obecności metki histydynowej. Metka histydynowa umożliwiała ponadto łatwe potwierdzenie proteolizy poprzez monitorowanie zaniku sygnału od przeciwciał rozpoznających tę sekwencję w technice *Western blot*. Doktorantka na przygotowanym nośniku białkowym prezentowała siedem miejsc aktywacji metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej i dziewięć sekwencji aktywujących kallikreiny. We wszystkich zaobserwowała ona zajście proteolizy, choć z różną wydajnością. Sekwencjonowanie końca N powstałych produktów pozwoliło jej na ustalenie miejsca proteolizy. W ten prosty i szybki sposób mgr Płaza doszła do wniosku, że gingipainy zdolne są aktywować zarówno prometaloproteazy, jak i prokallikreiny.

3. Aktywację komercyjnie dostępnych proenzymów metaloproteaz MMP15 i MMP17 z użyciem gingipainy R (w przypadku proformy MMP17 interpretacja danych była utrudniona). Z kolei aktywację prokallikreiny 13 doktorantka potwierdziła produkując proenzym w systemie *P. pastoris*. Wyniki były zgodne z uzyskanymi metodą CleavEx.
4. Pokazanie w eleganckim doświadczeniu, że metaloproteazy mogą być aktywowane gingipainą R dodaną do medium znad fibroblastów płucnych.
5. Ustalenie, że degradacja wyprodukowanych i oczyszczonych przez doktorantkę inhibitorów TIMP1 i TIMP2 zachodzi w obecności szczepu dzikiego *P. gingivalis* W83 i nie zachodzi w obecności mutantu delecyjnego gingipain. Podobne eksperymenty, wykonane na otrzymanych przez mgr Płazę inhibitorach kallikrein SPINK5 i SPINK6, prowadziły do ich degradacji pod wpływem gingipain.
6. Pokazanie, że degradacja tkanki płuc zachodzi nie tylko pod wpływem aktywności proteolitycznej enzymów gospodarza, ale także dotyczy destrukcji białka płucnego surfaktantu SP-A oraz kalgranulionu S100A8 i S100A9. W przypadku SP-A postulowano także udział innych proteaz w tym procesie.
7. Ustalenie miejsc proteolizy dla szeregu opisanych w powyższych punktach substratów białkowych.
8. Zaproponowanie w *Dyskusji* rozprawy sekwencji zdarzeń prowadzących do uszkodzenia płuc w wyniku działania proteaz gingipain. Zaproponowany schemat jest podsumowaniem i ukoronowaniem tego doktoratu.

Opisane powyżej najważniejsze wyniki doktoratu uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe. Oprócz tych, jakże skrótowo przedstawionych przeze mnie głównych wyników

doktoratu, w pracy znajduje się znaczna ilość wnikliwych analiz danych, które powodują, że doktorat czyta się jak dojrzałe opracowanie naukowe. Mgr Płaza w ramach pracy doktorskiej wykonała bardzo dużo doświadczeń, stosując przy tym całą gamę technik, o czym wspomniałem omawiając rozdział *Metody*.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Karoliny Płazy zatytułowanej: „Wpływ gingipain, cysteinowych proteaz produkowanych przez *Porphyromonas gingivalis* na zaburzenie funkcji ochronnych nabłonka dróg oddechowych. Identyfikacja potencjalnych mechanizmów wirulencji patogenu w kontekście wywołwanego zachłystowego zapalenia płuc” jest wysoce 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.



Jacek Otlewski