Politechnika Wrocławska

Wrocław, *7 stycznia 2015*

dr hab. **Marcin Drąg**
Zaklad Chemii Bioorganicznej
Wydzial Chemiczny
Politechnika Wroclawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Płazy

pt. „Wpływ gingipain, cysteinowych proteaz produkowanych przez *Porphyromonas gingivalis* na zaburzenie funkcji ochronnych nabłonka dróg oddechowych."

Wybór tematyki badawczej i celu pracy

Enzymy proteolityczne, inaczej nazywane proteazami należą do grupy hydrolaz odpowiedzialnych za hydrolizę wiązania peptydowego w substratach białkowych oraz peptydach. Ze względu na miejsce hydrolizy, proteazy możemy podzielić na egzopeptydazy oraz endopeptydazy. Proteazy są odpowiedzialne praktycznie za kontrolę wszystkich ścieżek metabolicznych, a także pełnią kluczową rolę w kontroli takich procesów jak programowana śmierć komórki (apoptoza), krzepnięcie krwi czy układ dopełniacza. Niestety, zachwianie równowagi w funkcjonowaniu proteaz prowadzi bardzo często do zaburzeń metabolicznych i poważnych stanów patologicznych. Enzymy proteolityczne są uważane za kluczowe w rozwoju takich chorób jak nowotwory, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne czy infekcje bakteryjne oraz wirusowe. Z tego względu proteazy cieszą się dużym zainteresowaniem firm farmaceutycznych poszukujących leków oraz innych terapii ukierunkowanych na te enzymy, a w ogólnej puli wszystkich badanych celów medycznych stanowią grupę około 10%.

Jednym z kluczowych parametrów opisujących proteazy jest zdolność do rozpoznawania i skutecznego hydrolizowania substratów o określonej sekwencji aminokwasów. Proces ten nazywany specyficznością substratową jest swoistym odciskiem palca każdej proteazy. W ostatnich latach rozwinięto wiele metod zarówno chemicznych jak i biochemicznych pozwalających z dość dużą dokładnością na określenie specyficzności substratowej praktycznie wszystkich typów proteaz. Uzyskane wiadomości pozwoliły na dokładniejsze poznanie specyfiki tych enzymów, w wielu przypadkach ułatwiły identyfikację naturalnych substratów, a także były wykorzystane do stworzenia specyficznych narzędzi do

Wyb. Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel. +48 (71) 320 4526
email: marcin.drag@pwr.edu.pl

badania proteaz w postaci substratów, inhibitorów oraz markerów tych enzymów. W znacznym stopniu specyficzności substratowa została wykorzystana także do zaprojektowania struktur wiodących dla obecnie znanych leków wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej czy cukrzycy, a których celem są proteazy.

Liczne doniesienia literaturowe w ostatnich latach wskazują na coraz to nowe choroby, w których proteazy mogą odgrywać kluczową rolę. Jednym z takich zagadnień naukowych postanowiła zająć się w swojej pracy doktorskiej Pani mgr Karolina Płaza. Praca ta była wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy oraz dra. Tomasza Kantyki.

Głównym celem pracy Doktorantki było dogłębne poznanie potencjalnego wpływu proteaz występujących w bakterii *Porphyromonas gingivalis* na powstanie zachłystowego zapalenia płuc. Szczególny nacisk w badaniach Doktorantka skierowała na proteazy z grupy gingipain, a w szczególności na ich zdolność do degradacji tkanki płuc oraz stabilność i mechanizm działania w środowisku gospodarza. Za pośredni cel pracy, Doktorantka wyznaczyła sobie opracowanie nowego typu uniwersalnego systemu do badania specyficzności substratowej, który miał być pomocny przy badaniu zdolności gingipain do aktywacji innych enzymów.

Opublikowany dorobek badawczy

Pani mgr Karolina Płaza jest autorem czterech publikacji w dobrych czasopismach recenzowanych z listy filadelfijskiej. Tematyka wszystkich publikacji związana jest z proteazami, a w szczególności z proteazami bakteryjnymi. Zaznaczyć należy, iż pozostałe, nieopublikowane wyniki pracy doktorskiej są na tyle wartościowe naukowo, iż z pewnością mogą być także materiałem na kolejne publikacje.

Poprawność doboru i analizy eksperymentów

Niezaprzeczalnym faktem jest, iż Doktorantka postawiła przed sobą trudne zadanie badawcze polegające na wyjaśnieniu mechanizmu działania gingipain w zachłystowym zapaleniu płuc. Analiza treści pracy wskazuje, iż aby przystąpić do realizacji tego zadania musiała także opracować całkowicie nowatorską metodę badania specyficzności substratowej, która pomogła w identyfikacji substratów gingipain. Powyższe dwa duże zadania badawcze wymagały wykonania bardzo dużej ilości eksperymentów zarówno w zakresie biochemii jak i biologii molekularnej. I rzeczywiście, część eksperymentalna pracy

zadania badawcze wymagały wykonania bardzo dużej ilości eksperymentów zarówno w zakresie biochemii jak i biologii molekularnej. I rzeczywiście, część eksperymentalna pracy jest bardzo rozbudowana i zawiera dokładne opisy wykonanych eksperymentów. Zauważyć należy, że eksperymenty zostały zaplanowane w logiczny i inteligentny sposób, a jakość ich opisania w pracy pozwoli na bezproblemowe ich powtórzenie przez innych badaczy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantce w pierwszym etapie badań udało się opracować system produkcji białek fuzyjnych złożony z sekwencji peptydowej, na którą składa się 10-11 aminokwasów na białku nośnikowym. Następnie system ten został wykorzystany do analizy zdolności hydrolizy sekwencji reprezentujących miejsce aktywacji zymogenu wybranych enzymów.

Podsumowując, wartość eksperymentalna zaprezentowanych nowych metod w pracy jest bardzo duża i oceniam ją bardzo wysoko. Przeprowadzone analizy wyników eksperymentalnych także są na wysokim poziomie. Uważam, że metoda badania specyficzności substratowej przy zastosowaniu autorskiego podejścia CleavEx z pewnością znajdzie zastosowanie w badaniu innych proteaz. Jedyna moja uwaga w aspekcie badań eksperymentalnych dotyczy stężenia DMSO użytego w badaniach z substratem fluorogenicznym. Prosiłbym o komentarz Doktorantki wyjaśniający wysokie 5% stężenie DMSO w tych badaniach. Doktorantka w opisie użytych odczynników przedstawia w większości tylko ich nazwę oraz źródło pochodzenia, natomiast nie przedstawia takiego kluczowego parametru jak czystość użytego odczynnika.

Oryginalność oraz najważniejsze wyniki pracy

Przedstawiona praca doktorska zawiera wiele wyników o wysokiej wartości naukowej i bardzo dobrym poziomie merytorycznym. Za najważniejsze odkrycia naukowe uważam:

1. Opracowanie prostego, o wysokiej ekspresji, dobrej rozpuszczalności i łatwego w oczyszczaniu systemu CleavEx do badania specyficzności substratowej proteaz.
2. Zastosowanie systemu CleavEx *in vitro* do eksperymentalnego wykazania, iż gingipainy mogą być potencjalnymi aktywatorami zymogenów macierzowych metaloproteaz oraz kalikrain.
3. Potwierdzenie badań in vitro poprzez obserwację wykazującą, iż metaloproteinazy mogą być aktywowane przez gingipainę R po inkubacji fibroblastów płucnych w medium komórkowym.

4. Eksperymentalne wykazanie, iż inhibitory TIMP dla macierzowych metaloproteaz są degradowane przez gingipainy, a tym samym wykazanie, że czynnikami wirulencji *P.gingivalis* inaktywującymi inhibitor są gingipainy.
5. Wykazanie, iż inhibitory kalikrein SPINK5 oraz SPINK6 są bardzo dobrze hydrolizowane przez gingipainy.
6. Wykazanie, że *P.gingivalis* jest w stanie skutecznie hydrolizować białko płucnego surfaktantu A (SP-A) zawarte w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych z ludzkich płuc, a także obserwacja iż gingipainy już w stężeniach subnanomolowych trawią to białko.
7. Wykazanie, iż gingipainy są w stanie skutecznie degradować białka o właściwościach przeciwbakteryjnych – kalgranulin S100A8 oraz S100A9, których podwyższoną ekspresję obserwuje się w chorobach zapalnych i w czasie infekcji.
8. Zaproponowanie mechanizmu opartego o aktywację macierzowych metaloproteaz oraz kalikrein, a także degradację inhibitorów tych enzymów przez gingipainy.
9. Wskazanie, iż dotchawicze podanie myszom *P.gingivalis* prowadzi do dramatycznego wzrostu ich śmiertelności.

W aspekcie uzyskanych wyników oraz zagadnień merytorycznych mam do Doktorantki następujące pytania:

1. Doktorantka wskazuje w pracy, iż gingipainy są proteazami cysteinowymi o aktywności zewnątrzkomórkowej. Z drugiej strony, powszechnie znanym jest także fakt, iż proteazy cysteinowe są aktywne praktycznie tylko wewnątrz komórki, gdyż tylko tam potencjał redukcyjny jest wystarczająco silny by utrzymać grupę katalityczną sulfhydrylową w postaci zredukowanej. Jak te dwa fakty można połączyć ze sobą?
2. Na stronie 125 Doktorantka wskazując na zalety swojej metody (CleavEx) wskazuje, iż niemożliwa jest synteza chemiczna peptydów zawierających w sekwencji reszty cysteiny oraz metioniny. Czy Doktorantka może wyjaśnić co było podstawą tego stwierdzenia. Jako chemik zajmujący się syntezą peptydów nie mogę się z tym zupełnie zgodzić.
3. W opisie proteaz neutrofilowych Doktorantka wskazuje na potencjalne funkcje neutrofilowej elastazy, proteinazy 3 oraz katepsyny G, natomiast nie wspomina o potencjalnej funkcji niedawno opisanej czwartej proteazy neutrofilowej NSP4. Jaki był powód nieuwzględnienia tego enzymu w opisie?

Uwagi redakcyjne

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 136 stron i mieści się w zwyczajowej normie objętościowej przyjętej dla tego typu prac. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są poprawne, a praca jest dodatkowo zobrazowana przez 7 rysunków, 38 figur oraz 15 tabel. Zastanawiające jest podpisywanie rysunków określeniem „figura". Nigdy nie spotkałem podobnego określenia przy opisie rysunków, zwłaszcza że termin ten jest używany tylko w części opisującej wyniki. Wydaje się, iż „figura" jest bezpośrednim zapożyczeniem z języka angielskiego, gdzie do podpisu rysunków używa się zwrotu „figure". Jest to chyba niepotrzebne, zwłaszcza że Doktorantka używa także do opisu rysunków zwrotu „rysunek". Wstęp teoretyczny do pracy liczy 27 stron i zawiera wszystkie niezbędne informacje na podstawie których sformułowana została hipoteza badawcza oraz zaplanowane zadania badawcze. Cel pracy został jasno przedstawiony na jednej stronie. Rozdział dotyczący materiałów i metod jest obszerny i liczy 36 stron. Wyniki pracy doktorskiej są przedstawione na 36 stronach. W liczącym 13 stron rozdziale dyskusja Doktorantka w dojrzały oraz wyważony sposób przedstawia osiągnięcia merytoryczne pracy w aspekcie już znanych wcześniej wyników innych badaczy. Bardzo podoba mi się Rysunek 7 przedstawiający potencjalny mechanizm działania gingipain w procesie uszkodzenia tkanki płuc. Literatura załączona do pracy liczy 206 pozycji i jest to imponujący wynik. Doktorantka bardzo dobrze cytuje oryginalną literaturę źródłową.

Praca jest napisana poprawną polszczyzną w jasny i klarowny sposób, niemniej zauważyć należy iż rozdział „Wstęp" jest napisany praktycznie bezbłędnie, natomiast w pozostałych rozdziałach występuje dość duża liczba literówek. Jako recenzent zobowiązany do krytycznej analizy wychwyciłem także następujące błędy terminologiczne czy gramatyczne:

1. Doktorantka bardzo często zapomina postawić przecinek przed „a".
2. W opisie odczynników użytych do badań Doktorantka zamiennie używa nazw własnych, struktur chemicznych lub nazw chemicznych. Opisy te powinny być ujednolicone.
3. Przyjętym jest, iż nazwy szczepów piszemy ukośną kursywą (italic). W pracy sporo jest opisów zwykłą czcionką.
4. Str. 64 – co oznacza słowo bazalne w zwrocie „...przewodnictwa wyższego niż bazalne."? – powinno raczej być bazowe.

5. Na przykład na str.67, jak i w wielu innych miejscach do opisu substratu fluorogenicznego Doktorantka używa skrótu VPR-AMC. W przypadku substratu, o którym mowa jest to określenie nie do końca poprawne, gdyż oznacza, iż substrat ten ma wolną N-końcową grupę aminową, co nie jest prawdą, gdyż jest tam grupa blokująca Boc. Poprawny skrót to Boc-VPR-AMC.
6. Doktorantka używa często zwrotu „sekwencji aminokwasowych". Poprawny zwrot to „sekwencji peptydowych aminokwasów".
7. Figura 13 i 16 jest mało wyraźna i trudna do analizy.

Niemniej, przedstawione poniżej błędy w żaden sposób nie wpływają na wysoką merytoryczną ocenę pracy, której logiczne ułożenie sprawia, iż czyta się ją przyjemnie.

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Płaza ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań w większości mają cechy nowości naukowej. Opisane w pracy wyniki oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym i jestem pewny, iż posłużą w przyszłości do prowadzenia dalszych badań, a także stanowią doskonały materiał do publikacji w dobrych czasopismach naukowych. Co więcej, biorąc pod uwagę nowatorstwo, znaczenie oraz szerokie spektrum prowadzonych badań opisanych w rozprawie oraz dorobek naukowy doktorantki stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karolina Płaza spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane tego typu pracom naukowym i zasługuje na wyróżnienie odpowiednią nagrodą. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę więc do wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.