Dr hab. Marcin Okrój
Zakład Biologii Komórki
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk
Tel. (58) 3491410
e-mail: marcin.okroj@gumed.edu.pl

Gdańsk, 5 stycznia 2018 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Ewy Bieleckiej
pt. „Badanie specyficzności substratowej i rola deiminaz peptydyloargininowych w modulacji stanu zapalnego"

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Ewy Bieleckiej dotyczy deiminaz peptydyloargininowych - enzymów katalizujących przekształcenie argininy do cytruliny. Badania nad tą rodziną enzymów są cenne z uwagi na ich udokumentowany udział w procesach patologicznych takich jak łuszczyca, stwardnienie rozsiane, różne rodzaje nowotworów czy reumatoidalne zapalenie stawów oraz z uwagi na sugerowaną ostatnio rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej. U człowieka zidentyfikowano 5 deiminaz peptydyloargininowych: odpowiednio PAD 1-4 oraz PAD6. Ponadto ważnym z racji procesów chorobotwórczych źródłem aktywności deiminizacyjnej jest enzym pochodzący z bakterii odpowiedzialnej za rozwój parodontozy - *Porphyromonas gingivalis*, określany jako PPAD (ang. Porphyromonas peptydylarginine deiminase). Doktorantka w swojej pracy przeprowadziła badania nad specyficznością substratową dwóch samodzielnie nadprodukowanych w systemie bakteryjnym ludzkich deiminaz: PAD2 i PAD4 oraz nad modyfikacją przez ww. enzymy białek układu dopełniacza i receptorów aktywowanych proteazą. Druga część pracy stanowi cykl doświadczeń opisujących cytrulinizację anafilatoksyny C5a przez bakteryjny enzym PPAD. Doktorantka przedstawiła wpływ takiej modyfikacji na aktywność biologiczną C5a oraz wywoływane poprzez C5a mechanizmy efektorowe takie jak chemotaksja i wybuch tlenowy neutrofili. Warto zauważyć, iż wyniki doświadczeń opisywane w drugiej części pracy weszły w skład publikacji w Journal of Biological Chemistry (JBC, 2014; 289: 32481-7), której doktorantka jest pierwszym autorem. Mgr Ewa Bielecka jest także współautorem siedmiu innych publikacji o podobnej tematyce skupiającej się na interakcji bakteryjnych patogenów z elementami odporności nieswoistej gospodarza czy układów zapewniających homeostazę organizmu. Swoimi badaniami doktorantka wpisuje się w ważny trend w badaniach nad modulacją odpowiedzi immunologicznej przez modyfikacje posttranslacyjne białek i już na wstępie chciałbym pogratulować jej oraz Promotorowi otrzymanych, ciekawych i ważnych wyników.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona rozprawa doktorska obejmuje 143 strony wydruku komputerowego w formacie A4, na które składa się 30 stron wstępu, 5 stron opisu użytych do doświadczeń materiałów, 17 stron opisu metod. Wyniki opisane są na 25 stronach, 29 stron zajmuje dyskusja. Ponadto praca zawiera streszczenie w językach polskim oraz angielskim, spis literatury, bardzo przydatny wykaz stosowanych skrótów a także osobno sformułowane cele pracy, podsumowanie i wnioski końcowe. Jest to układ typowy dla monograficznych rozpraw doktorskich. W moim odczuciu praca została napisana starannie, zrozumiałym a jednocześnie fachowym językiem. W całej pokaźnej objętości znalazłem jedynie cztery błędy literowe / edytorskie. Podział na podrozdziały i akapity nadaje pracy przejrzystości i odzwierciedla logiczny układ treści. Z drobnych uwag wymienić należy brak konsekwencji w przytaczaniu znaczenia skrótów przy ich pierwszym użyciu, przy czym trzeba zauważyć, iż w większości przypadków taka zasada została zachowana.

Ocena merytoryczna ogólna

Na stronie 49 sformułowano osiem wyodrębnionych celów pracy. W moim pojęciu wszystkie one, z jednym małym wyjątkiem, zostały w zrealizowane. Problem, który nastąpił w trakcie pracy, lecz do którego

doktorantka uczciwie się przyznaje to niska ekspresja ludzkiego rekombinowanego enzymu PAD2. Niski poziom nadprodukcji w systemie bakteryjnym był praprzyczyną mało wydajnego oczyszczania. Jak zrozumiałem, pierwotnym celem było również przeprowadzenie analogicznych analiz białka PAD2 jak miało to miejsce dla enzymu PAD4 a z części z nich zrezygnowano w obliczu niemożności uzyskania odpowiedniej ilości białka o zadowalającym stopniu oczyszczenia. Tym niemniej praca zawiera wyniki doświadczeń możliwych do przeprowadzenia przy użyciu dostępnej puli PAD2, do interpretacji których doktorantka podchodzi z rezerwą w dyskusji. Pozostała część pracy zawiera wyniki otrzymane dla białka PAD4 oraz bakteryjnego analoga PPAD. Są one, jak w przypadku wyników odnoszących się do PPAD, opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania lub mogą stać się przedmiotem samodzielnej publikacji jak w przypadku wyników uzyskanych dla białka PAD4. Powyższe fakty pozwalają stwierdzić, iż praca jest nasycona istotnymi wynikami, które kompensują niepowodzenie przy zakładanej pierwotnie analizie ludzkiej deiminazy PAD2. Wnioski dotyczące preferencji substratowej białka PAD4 oparte są na wynikach doświadczeń uzyskanych kilkoma niezależnymi metodami badawczymi. O ile użycie pojedynczych metod i wyciąganie na podstawie otrzymanych wyników wniosków może być obarczone błędami wynikającym ze specyficznej konstrukcji narzędzi takich jak kombinatoryczne biblioteki substratowe (wrócę do tego zagadnienia w uwagach szczegółowych), znakowane substraty czy istnieniem artefaktów wynikających z samego algorytmu analizy danych, o tyle doktorantce udało się wyodrębnić wynik spójny dla zastosowanych różnych metod, konkretnie preferencję reszty asparaginy w pozycji P1 w substratach PAD4. Stanowi to przykład rzetelnej interpretacji i krytycznej oceny otrzymanych wyników. Podobnie, doktorantka proponuje w dyskusji ulepszony schemat konstrukcji bibliotek substratowych na potrzeby badania specyficzności substratowej białka PAD4 i rzetelnie opisuje możliwe problemy wynikające z zastosowania bibliotek przeznaczonych pierwotnie do innych celów. Świadomość ograniczeń stosowanych metod badawczych jest ważną cechą dojrzałego naukowca. Dzięki pracy mgr Ewy Bieleckiej można z dużą dozą prawdopodobieństwa stwierdzić, iż enzym PAD4 posiada określoną specyficzność substratową, iż jego aktywność może wpływać (przy założeniu współobecności w tym samym kompartmencie) na dojrzewanie i aktywację składowych układu dopełniacza oraz na funkcję ludzkich receptorów aktywowanych proteolizą PAR2 i PAR4. Podobnie, jako znaczący fizjologicznie można przyjąć opublikowany i wspomniany wcześniej efekt modulacyjny bakteryjnego enzymu PPAD wobec ludzkich składowych odporności nieswoistej. Te dwa elementy uważam za najważniejsze osiągnięcia pracy.

Opis zastosowanych metod jest bardzo szczegółowy i pozwala na odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń przez osobę wykwalifikowaną. Dodatkowo, w sytuacji kiedy daną specjalistyczną analizę (np. wykonanie spektrometrii masowej) przeprowadzili współpracownicy doktorantki, towarzyszy temu stosowna adnotacja w tekście oraz wyczerpujący opis przygotowania próby.

Otrzymane wyniki wraz z opisem ich uzyskania i interpretacją uznaję jako istotny wkład do wiedzy na temat deiminaz peptydyloargininowych oraz jako adekwatne do tytułu rozprawy doktorskiej.

Uwagi szczegółowe, pytania i kwestie do przedyskutowania w trakcie publicznej obrony.

Moja pierwsza i najważniejsza wątpliwość dotyczy sposobu optymalizacji ekspresji ludzkich białek PAD2 oraz PAD4. W dziale dyskusja na stronie 103 czytamy, iż w trakcie prób ekspresji w systemie bakteryjnym sprawdzano różne kombinacje warunków takich jak gęstość optyczna w momencie indukcji, stężenie induktora, czas oraz temperatura hodowli w czasie indukowanej ekspresji. Czy przetestowano klasyczne warunki indukcji przy pomocy IPTG czyli hodowlę przez czas 2-4 godzin po indukcji w temperaturze 30 °C i jeśli tak, to na ile wyniki różniły się od wyników otrzymanych według procedury opisanej w pracy? W przypadku jedynie minimalnej różnicy na korzyść opisywanych w pracy warunków lecz ogólnie niskim poziomie ekspresji w obydwu warunkach zachodzi podejrzenie, iż problemem była sekwencja mRNA białka PAD2 niekompatybilna z bakteryjnymi systemami ekspresji. Być może lepsze efekty można było uzyskać poprzez optymalizację polegającą na zastąpieniu tzw. rzadkich kodonów, ustaleniu odpowiedniego stosunku par GC w cDNA i wyeliminowaniu potencjalnych niekorzystnych struktur mRNA. Na rycinie 1 odnoszącej się do nadprodukcji i oczyszczania białka PAD4 znajduje się obraz elektorforezy próbek osadu bakteryjnego przed

oraz po indukcji IPTG. Z kolei na rycinie 2A odnoszącej się do analogicznego procesu pozyskiwania białka PAD2 brakuje próbek osadu bakteryjnego przed oraz po indukcji IPTG. Wnioskując z obrazu elektroforetycznego próbek z kolejnych etapów oczyszczania, ilość białka PAD2 po indukcji musiała być sporo niższa niż w przypadku PAD4 i na tyle niska, aby skutecznie utrudnić proces dalszego oczyszczania. Nasuwa to wątpliwości co do wydajności samej indukcji, która według opisu zawartego w dziale „metody" odbywała się w dość nietypowych warunkach, mianowicie była prowadzona przez 14 godzin w temperaturze 12 °C. Z jednej strony obniżona w stosunku do tradycyjnej (30 °C) temperatura mogła wpływać na niższe tempo metabolizmu bakterii i prawidłowe fałdowanie nadprodukowanych białek. Z drugiej strony jednak 14 godzin jest czasem na tyle długim, iż kontynuowanie hodowli przy ciągłej produkcji b-laktamaz (produkcja i sekrecja tego enzymu jest istotą oporności na ampicylinę, charakterystyczną dla plazmidu pET16b) mogło skutkować zanikiem presji selekcyjnej w postaci obecności antybiotyku w pożywce oraz przerostem hodowli przez bakterie nie posiadające plazmidu niosącego pożądany gen. Będę wdzięczny za odniesienie się do wspomnianych wyżej kwestii w czasie ustnej obrony.

Na stronie 33 pojawia się informacja iż otoczka złożona z anionowych polisacharydów chroni bakterie *Porphyromonas gingivalis* przed atakiem układu dopełniacza. Zakładam, iż jest to ochrona częściowa gdyż w przeciwnym razie postulowana chwilę później i podparta cytowanymi wynikami badań rola gingipain, proteaz specyficznych dla *P. gingivalis*, w ochronie przed dopełniaczem czy wymienionym konkretnie kompleksem atakującym błonę byłaby dyskusyjna. Czy znane są wyniki badań pokazujące wrażliwość mutantów *P. gingivalis* pozbawionych otoczki polisacharydowej na atak układu dopełniacza? Innymi słowy, czy stwierdzenie ze strony 33 opiera się na konkretnych danych czy jest jedynie ekstrapolacją poważanej powszechnie tezy o roli otoczki polisacharydowej jako niespecyficznej ochrony przed mechanizmami odporności?

We wstępie na stronie 24 znajduje się hipotetyczny opis regulacji ekspresji genów zależnych od metylacji histonów przez białko PAD4. Poprosiłbym o dodatkowe wyjaśnienie zdania „Deiminacja reszt argininy (cytrulina nie stanowi substratu dla metylotransferaz) oraz zmniejszenie liczby arginin już zmetylowanych może podwójnie obniżać poziom ekspresji takich genów". Rozumiem, iż deiminazy mogą modyfikować zarówno argininę jak i jej zmetylowaną pochodną. Czy zatem metylacja argininy ma odmienny wpływ na ekspresję genów zależnych od metylacji niż obecność grupy metylowej na cytrulinie?

W opisie wyników na stronach 76 i 77 pojawia się lakoniczna informacja o konieczności zastosowania różnych metek znakujących białka PAD2 i PAD4 oraz niemożności użycia metki GST dla białka PAD2 z uwagi na specyfikę białka. Co konkretnie kryje się pod tym zapisem? Czy chodzi o możliwość krytycznej zmiany konformacji PAD2 przez użycie zredukowanwgo glutationu do ewentualnej elucji czy o inne względy niewynikające wprost z treści pracy?

Na stronie 10 znajduje się ogólny opis układu dopełniacza i informacja, iż składa się z ponad 20 białek. Z kolei na stronie 38, w rozszerzonym opisie kaskady dopełniacza pojawia się wzmianka o ponad 30 białkach. Niektórzy autorzy przyjmują, iż do układu dopełniacza należy zaliczyć niektóre miejscowospecyficzne inhibitory i według takiej rachuby pojawiają się liczby 40 i więcej białek. Sądzę, iż warto uszczegółowić kryteria i na potrzeby pracy przyjąć jedną, spójną wersję.

Na stronie 20 doktorantka podkreśla, iż ludzkie deiminazy nie posiadają sekwencji sygnałowych wyprowadzających dojrzałe białko na zewnątrz komórki i należy przyjąć iż ich działanie ogranicza się do przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Jednocześnie chwilę później pojawiają się sugestie o aktywności deiminaz przejawiających się poza komórką jak cytrulinacja białka MBP przez makrofagi naciekające tkankę nerwową. Dopiero w dyskusji pojawia się informacja o możliwym mechanizmie wypływu deiminaz do środowiska zewnątrzkomórkowego wskutek procesów patologicznych i degeneracyjnych. W moim pojęciu takie wyjaśnienie powinno pojawić się wcześniej, już we wstępie pracy gdyż może wprowadzać niejasność co do zasadności niektórych tez.

Na stronie 40 doktorantka twierdzi, iż czynnik H jest inhibitorem drogi alternatywnej oraz klasycznej układu dopełniacza. Według znanych mi pozycji literaturowych sytuacja, w której czynnik H hamuje drogę klasyczną jest nietypowa i odnosi się jedynie do niekanonicznych sposobów aktywacji ścieżki klasycznej przez np. anionowe fosfolipidy czy składowe LPS. Jeśli te właśnie sytuacje doktorantka miała na myśli, stosowne byłoby opatrzenie takiego stwierdzenie stosownym cytatem gdyż w innej sytuacji osoba mająca powierzchowną wiedzę na temat układu dopełniacza może poczytać je za błąd. Tym niemniej nawiązując do funkcji czynnika H, pomimo że jest on inhibitorem konwertaz alternatywnych a jego celem molekularnym jest białko C3b, jego obecność rzeczywiście może hamować aktywność dopełniacza aktywowanego pierwotnie poprzez kanoniczne inicjatory drogi klasycznej lub lektynowej. W momencie, kiedy wchodzimy w niuanse, opis takiego scenariusza byłby stosowny, jak również uzupełnianie uproszczonego schematu układu dopełniacza na stronie 39 o istotny w tym kontekście element.

W opisie materiałów na stronie 54 widnieje charakterystyka linii komórkowej U937, do której w moim przekonaniu wkradł się błąd. Linia U937 jest linią monocytarną wyizolowaną w roku 1974 od pacjenta z chłoniakiem, natomiast nie znalazłem żadnej informacji o związku tej linii z wątrobiakiem HepG2, jak zasugerowano w pracy. Według informacji dostępnej na stronach repozytorium ATCC obydwie linie różnią się znacznie profilem eksprymowanych białek.

Moje ostatnie pytanie dotyczy kombinatorycznych bibliotek substratowych. Jestem świadomy, iż zostały one skonstruowane i udostępnione doktorantce przez współpracujących z nią chemików, zatem pytanie może wykraczać poza zakres kompetencji biologa molekularnego. Niemniej chciałbym poprosić o komentarz na ile można być pewnym, iż peptydy wchodzące w ich skład zawierają zgodnie z opisem (strona 89) w badanych pozycjach P1, P2, P3 lub P1' równomolowe ilości każdego z 19 naturalnie występujących aminokwasów? Zakładam, iż biblioteki zostały zsyntetyzowane na nośniku stałym, która to metoda jest wygodnym sposobem tworzenia bibliotek różniących się pojedynczą resztą aminokwasową w danej pozycji. Teoretycznie umieszczenie w mieszaninie acylującej równomolowych ilości pochodnych aminokwasów nie gwarantuje ich równomiernej inkorporacji do łańcucha polipeptydowego z uwagi na różną wydajność acylowania danym aminokwasem. Czy twórcy biblioteki dodatkowo weryfikowali skład aminokwasowy w danej pozycji pod kątem postulowanego, równego rozkładu?

Wnioski końcowe

Całokształt pracy mgr Ewy Bieleckiej przedstawiony w rozprawie doktorskiej oceniam bardzo wysoko jako znaczący wkład w poszerzenie wiedzy na temat roli deiminaz peptydyloargininowych w modulacji stanu zapalnego oraz wiedzy na temat czynników wirulencji patogenu *Porphyromonas ginvivalis*. Niezależnym od mojej oceny potwierdzeniem tego faktu jest publikacja części przedstawionych wyników w poczytnym czasopiśmie naukowym. Doktorantka wykazała, iż potrafi posługiwać się wieloma różnorodnymi technikami laboratoryjnymi oraz krytycznie podchodzić do otrzymanych przez siebie wyników i prawidłowo interpretować je w świetle dostępnej w temacie wiedzy. Przedstawione przeze mnie uwagi nie powinny umniejszać charakteru osiągnięcia mgr Bieleckiej a większość, o ile nie wszystkie nieścisłości, można wyjaśnić podczas ustnej, publicznej obrony pracy doktorskiej. Podsumowując, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r poz. 249 i 1767) wymagane do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Gratulując jeszcze raz Doktorantce oraz Panu Promotorowi cennych i ważnych wyników oraz wartościowej pracy doktorskiej zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Ewy Bieleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-GUMed
Zakład Biologii Komórki
dr hab. Marcin Okrój