Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

PRACOWNIA BIOLOGII MEDYCZNEJ
ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Teresa Olczak
Tel. 71 3752 612
E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 30.11.2017 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Nowakowskiej pt. „Rola fosforylacji w sekrecji gingipain i wirulencji *Porphyromonas gingivalis* "

Rozprawa doktorska mgr Zuzanny Nowakowskiej została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy. Promotor Doktorantki oraz jego zespół od wielu lat zajmują się badaniami skoncentrowanymi na czynnikach odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój przewlekłych chorób przyzębia, w tym na wirulencji bakterii *Porphyromonas gingivalis*, ze szczególnym uwzględnieniem roli gingipain. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez mgr Zuzannę Nowakowską wpisuje się w nurt tych badań i jest jej istotną kontynuacją. Rozprawa doktorska liczy 142 strony i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki pracy badawczej i z powodzeniem może stanowić podstawę do dobrej i pomocnej pracy przeglądowej, porządkującej aktualną wiedzę dotyczącą udziału gingipain w chorobach przyzębia. Rozdziały Materiały i metody, Wyniki oraz Dyskusja zakończone są krótkim podsumowaniem w postaci wniosków. Piśmiennictwo obejmuje 186 pozycji literaturowych, z czego większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności zgłębianego problemu naukowego.

Głównym celem pracy doktorskiej była dalsza charakterystyka gingipain, polegająca na odpowiedzi na pytania: a) Czy za proponowaną fosforylację preprogingipain w cytoplazmie bakterii odpowiada nietypowy, dwuskładnikowy system PorXY (czyli regulator odpowiedzi ulegający fosforylacji przez kinazy oraz białko o charakterze kinazy) ? b) Czy fosforylacja reguluje sekrecję, potranslacyjne modyfikacje i aktywność gingipain ? c) Czy ten proces ma istotne znaczenie dla wirulencji bakterii *P. gingivalis* i aktywacji układu odpornościowego gospodarza ? Do realizacji celu pracy doktorskiej mgr Zuzanna

Nowakowska wykorzystała różnorodne podejścia badawcze, polegające zasadniczo na: a) analizie wpływu białek systemu PorXY na aktywność, sekrecję i dojrzewanie gingipain; b) analizie udziału systemu PorXY w fosforylacji gingipain; c) analizie wpływu modyfikacji proponowanych funkcjonalnych reszt aminokwasowych białek systemu PorXY na ich rolę w fosforylacji gingipain; d) analizie wpływu podstawienia reszt tyrozyny i treoniny, potencjalnie wskazanych jako cele do fosforylacji gingipain, na sekrecję i potranslacyjne modyfikacje gingipain w szczepach o różnym tle genetycznym; e) analizie znaczenia systemu PorXY w wirulencji bakterii *P. gingivalis* i odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane, a pytania wynikające z uzyskanych wyników oraz nierozwiązane problemy naukowe stanowią dobrą podstawę do kontynuacji tych badań.

W rozdziale Materiały i metody zostały szczegółowo i w sposób bardzo klarowny przedstawione odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane w pracy doktorskiej. Do realizacji celów badawczych Doktorantka wykorzystała nie tylko klasyczne metody biochemiczne z zastosowaniem oczyszczonych białek, ale także metody z zastosowaniem wielu szczepów bakteryjnych, pozbawionych określonych genów kodujących badane białka, a następnie zweryfikowała niektóre hipotezy z zastosowaniem modelu zwierzęcego. Na szczególną uwagę zasługuje skonstruowanie tak wielu plazmidów oraz zmodyfikowanych za ich pomocą szczepów bakteryjnych oraz analiza fenotypowa uzyskanych szczepów, z wykorzystaniem różnego tła genetycznego. Świadczy to nie tylko o pracowitości Doktorantki, która poprzez realizację swojej pracy doktorskiej dała znakomite podwaliny do dalszej pracy badawczej, ale przede wszystkim o ogromnej determinacji w zgłębianiu wiedzy i dążeniu do nowych odkryć. Zastosowanie interdyscyplinarnych metod i technik, m.in. z zakresu biologii molekularnej, biochemii, mikrobiologii, hodowli bakteryjnych i komórkowych, doświadczeń wykonanych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* świadczy nie tylko o dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki, która do realizacji postawionych zadań potrafi sama dobrać lub zastosować wskazane przez innych odpowiednie metody badawcze, ale także o nabytych, szerokich umiejętnościach praktycznych.

W obszernym rozdziale Wyniki Recenzent nie zauważył błędów merytorycznych, a uzyskane dane są przedstawione w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna część to wyniki nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki gingipain. Należy do nich zaliczyć m.in. wyniki uzyskane z wykorzystaniem konstrukcji i charakterystyki szczepów delecyjnych, a zwłaszcza bardzo szczegółową analizę gingipain, polegającą na obserwacji

zmian w dojrzewaniu i sekrecji tych enzymów oraz analizie ekspresji genów kodujących gingipainy. Takie postępowanie pozwoliło ostatecznie na wskazanie systemu PorXY, a zwłaszcza białka PorX, jako odpowiedzialnego za fosforylację preprogingipain oraz na identyfikację funkcjonalnych domen i reszt aminokwasowych białek systemu PorXY i ich udział w przekazywaniu sygnału. Na uwagę zasługuje także zbadanie wpływu białka PorX na inne enzymy na przykładzie aminopeptydaz. Co istotne, przy tak ogromnej ilości danych, często trudnych do wyjaśnienia lub pozornie sprzecznych, Doktorantka zachowuje dystans i ostrożność w formułowaniu wniosków. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są interesujące przede wszystkim z punktu widzenia badań podstawowych. Ale, jak wskazuje mgr Zuzanna Nowakowska, mogą one dostarczyć w przyszłości istotnych danych dla badaczy poszukujących nowych celów do opracowania nowej generacji metod terapeutycznych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka krytycznie ocenia wyniki i ich potencjalne znaczenie oraz odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze. Zadaje także wiele pytań i proponuje kierunki dalszych badań. Pomimo bardzo klarownego przedstawienia uzyskanych wyników oraz obszernej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej:

1) W pracy doktorskiej przedstawiono i przedyskutowano wyniki uzyskane przez innych dla szczepu ATCC 33277, który jest mniej wirulentny, niż np. wykorzystywany przez Doktorantkę szczep W83. Różni się on istotnie niektórymi regionami genomu i wynikającymi z tego odmiennymi właściwościami, ujawniającymi się zwłaszcza po inaktywacji niektórych genów biorących udział w regulacji ekspresji genów i/lub mających wpływ na systemy dwuskładnikowe, a tym samym będących składnikami wielopoziomowej siatki regulatorowej. Doktorantka sugeruje ten fakt w swojej pracy, ale Recenzent prosi o dodatkowe wyjaśnienie, jaki to może mieć wpływ na wyniki uzyskane przez Doktorantkę, a także na planowane i proponowane w przyszłości doświadczenia ?
2) Zakładając, że do pełnej fosforylacji wymagana jest aktywność współpracujących ze sobą produktów genów kodujących białka PorX i PorY, jak można wytłumaczyć brak istotnych różnic w fenotypie mutanta w przypadku inaktywacji genu *porY* ? Doktorantka sugeruje pewne rozwiązania, ale Recenzent prosi o bardziej szczegółowe odniesienie się do tego problemu. Dlaczego nie skonstruowano i nie zanalizowano podwójnego mutanta z nieaktywnymi genami *porX* i *porY* ?
3) Czy istnieją jakieś dane lub sugestie na temat znaczenia systemu PorXY w fosforylacji innych białek, aniżeli gingipainy i czy może to pośrednio wpływać na dojrzewanie i sekrecję gingipain ? Jeśli tak, to jakie białka mogą być kandydatami ?

4) W niektórych przypadkach analizy dojrzewania gingipain, badanej z wykorzystaniem techniki Western blotting (np. rycina 8, 9, 10), wyniki uzyskane dla kontroli PorX+ odbiegają nieco od wyników uzyskanych dla szczepu dzikiego (W83). Jakie mogą być przyczyny zaobserwowanych zmian ? W przypadku kontroli PorY+ takich zmian praktycznie nie obserwuje się.
5) W jaki sposób Doktorantka zamierza w przyszłości praktycznie udowodnić fosforylację zachodzącą *in vivo* we wskazanych regionach preprogingipain ?

Pod względem merytorycznym i edytorskim praca jest napisana znakomicie i praktycznie nie można znaleźć w niej błędów, a zauważone przez Recenzenta drobne, wybrane nieścisłości, wykazane są jedynie z obowiązku. Są to m.in. określenia: „nie mniej jednak", „..zbudowana z 80 aminokwasów..." (str. 20), „żel poliakrylamidowy", „roztwór do barwienia żeli", „roztwór do barwienia membran", zamiennie stosowane wyrażenia metoda „Western blotting" i metoda „Western blot" (str. 58 i wielokrotnie w rozdziale Wyniki), „Gęstość optyczna mierzona była przy 600 nm." (opis ryciny 5 na str. 66), komórki TIGK wyjaśnione jako „tumor-immortalized gingival keratinoctes".

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Zuzanny Nowakowskiej nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 5 prac, opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach. Wskazuje to na duże prawdopodobieństwo opublikowania wyników przedstawionych w pracy doktorskiej również w znakomitym czasopiśmie naukowym. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w pracy doktorskiej oraz pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Zuzanny Nowakowskiej pod względem naukowym całkowicie spełnia 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 z dnia 30 października 2015 roku. Dlatego też, wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Nowakowskiej stosowną nagrodą.