Kraków, 2.01.2018.

Prof. dr hab. Jerzy Silberring
Katedra Biochemii i Neurobiologii
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Mgr Dominiki Kamili Staniec
pt. *"Biochemiczna i strukturalna charakterystyka peptydazy cysteinowej Tpr Porphyromonas gingivalis W83"*

Rozprawa, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pana Prof. Dr hab. Jana Potempę, dotyczy dokładnego opisu charakterystyki peptydazy cysteinowej Tpr uczestniczącej w wirulencji szczepu *Porphyromonas gingivalis*. Charakterystyka ta obejmuje zarówno parametry biochemiczne, jak i rozwiązanie krystalograficznej struktury białka, wraz z podaniem specyficzności substratowej oraz mechanizmu inhibicji.

Praca doskonale wpisuje się w długofalowy projekt, prowadzony przez zespół Promotora, obejmujący poszukiwania molekularnych mechanizmów, będących podstawą etiologii parodontozy. Ta przewlekła choroba przyzębia, dotykająca sporej części populacji, skutkuje stopniowym niszczeniem tkanki łącznej w dziąsłach, prowadząc do ew. utraty zębów i przyczyniając się, m.in. poprzez indukcję stanów zapalnych, do rozwoju innych chorób. Przyczyną parodontozy mogą być czynniki wirulencji, wydzielane przez t.zw. "czerwony kompleks", w skład którego wchodzą

bakterie z gatunków *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola i Tannerella forsythia*. Zespół, kierowany przez Promotora prowadzi od wielu lat nowatorskie badania nad rolą enzymów proteolitycznych jako czynników wirulencji w rozwoju paradontozy, czego efektem jest też recenzowana przeze mnie praca.

Cele pracy zostały jasno określone i stanowią cenny i oryginalny wkład do nauki międzynarodowej. Wymienić tu należy:

- ✓ charakterystykę biochemiczną enzymu;
- ✓ rozwiązanie struktury przestrzennej peptydazy Tpr;
- ✓ opisanie procesów autoaktywacji i autoinhibicji Tpr
- ✓ określenie specyficzności substratowej i roli Tpr jako czynnika wirulencji.

Metody badawcze zostały dobrane poprawnie a ich klarowny opis oraz uzyskane rezultaty, poparte adekwatną liczbą rycin, wykresów i tabel, nie budzą zastrzeżeń a ich opisy są rzetelne.

Dysertacja ma klasyczny układ, obejmujący Wprowadzenie, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski. Całość poparta jest adekwatnym piśmiennictwem (142 pozycje), uwzględniającym najnowsze doniesienia literaturowe. Rozprawa, napisana w języku polskim, liczy 97 stron i jest jedną z najbardziej zwięzłych w zakresie biochemii, jakie miałem przyjemność recenzować. To ogromna zaleta i duża umiejętność Doktorantki, potrafiącej w sposób syntetyczny opisać naprawdę duży zakres przeprowadzonych prac. Prezentowany dorobek jest oryginalny i stanowi nowość naukową, co poparte jest szeregiem publikacji.

Do najważniejszych osiągnięć Pani Mgr Dominiki Kamili Staniec zaliczyć należy:

- ➢ określenie właściwości biochemicznych proteazy Tpr (w tym autoaktywacja i aktywność enzymatyczna)
- ➢ opisanie specyficzności substratowej z zastosowaniem biblioteki kombinatorycznej oraz porównanie tych cech z kalpainami
- ➢ określenie fizjologicznych substratów Tpr
- ➢ rozwiązanie struktury przestrzennej enzymu Tpr metodami krystalograficznymi

Za istotne osiągnięcie uważam wykazanie nie tyle podobieństw, ale różnic pomiędzy kalpainami a Tpr, odpornej na degradację w obecności jonów wapnia, pomimo pewnych analogii struktur przestrzennych. Ponadto, wykazanie, że Tpr aktywowana jest poprzez autoproteolizę, zasługuje na podkreślenie, przy czym nie dziwi zachodzenie tego procesu już w temperaturze 21^0C, co zapewne spowodowane jest wysoką aktywnością enzymu w próbce. Niezwykle interesujący jest też fakt, że Tpr, zlokalizowana w zewnętrznej błonie bakterii, generuje sekwencje peptydowe służące następnie do produkcji energii *P. gingivalis*. Ciekawa jest też informacja o niezależności działania Tpr, proteazy cysteinowej, od obecności czynników redukujących, takich jak DTT czy L-cysteina. Jak słusznie zauważa Doktorantka, może to sugerować zachowanie aktywności proteolitycznej Tpr, nawet w niesprzyjających warunkach fizjologicznych.

Zadania, postawione przed Doktorantką, zostały zrealizowane w całości, a uzyskane wyniki, traktowane całościowo, mogłyby stanowić solidną podstawę habilitacji. W pracy nie zauważyłem poważniejszych błędów, wychodząc z założenia, że młodej Uczonej, publikującej m.in. w J.Biol.Chem. nie wytyka się braku przecinków i kropek. Szkoda natomiast, że do rozprawy nie dołączono kopii publikacji.

W związku z interesującymi wynikami, uzyskanymi w trakcie realizacji projektu doktorskiego, nasuwa się kilka pytań, które z przyjemnością przedyskutuję z Doktorantką w trakcie publicznej obrony:

- w jaki sposób przygotowywano próbki rekombinowanego białka do sekwencjonowania metodą degradacji Edmana (Ryc. 8, str. 31)
- w opisie metodyki nie podano szczegółów analizy z zastosowaniem spektrometrii mas. Jaki % sekwencji uzyskano, posługując się techniką MALDI TOF/TOF, a jaki metodą ESI/MS?

Dorobek naukowy Pani Mgr Staniec obejmuje 4 prace opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych oraz 2 wystąpienia ustne i 5 posterowych, prezentowanych w trakcie konferencji międzynarodowych i krajowych. W jednej z tych publikacji (J.Biol.Chem.), Pani Staniec jest pierwszym autorem. Doktorantka realizowała swój projekt w ramach uzyskanego grantu "Preludium" oraz dzięki

stypendium przyznanym przez Svenska Institutet na pobyt w Uniwersytecie w Lund, Szwecja w latach 2012-2014.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim i stanowi nowość naukową. Spełnione są również formalne wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011r. nr 84, poz. 455). Zatem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani Mgr Dominiki Kamili Staniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają duże znaczenie w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób przyzębia. Całościowe opisanie jednej z ważniejszych proteaz *P. Gingivalis*, z podaniem struktury przestrzennej i specyficzności substratowej wraz z mechanizmem aktywacji i autoinhibicji, budzi moje uznanie. Dodatkowo, dorobek Doktorantki potwierdza Jej wysokie kompetencje naukowe na wysokim poziomie międzynarodowym, co w pełni uzasadnia zaproponowanie Wysokiej Radzie wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Jerzy Silberring