Politechnika Wrocławska

Wrocław, 31 maja 2019

prof. dr hab. Marcin Drąg
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Zielińskiej

pt. „Identyfikacja i charakterystyka proteazy fibrynolitycznej (MfpA) produkowanej przez bakterie z rodzaju *Microbacterium*"

Enzymy proteolityczne stanowią około 5 do 10% celów medycznych przy poszukiwaniu leków, ale także są intensywnie wykorzystywane jako narzędzi służące w nowoczesnej biotechnologii. Oprócz ludzkich proteaz, jedną z najintensywniej badanych grup stanowią te, które występują w bakteriach. Wiąże się to między innymi z ich potencjalnym wykorzystaniem przy poszukiwaniu nowych metod terapii w medycynie, czy innymi potencjalnymi właściwościami aplikacyjnymi w przemyśle. Jednym z takich zagadnień naukowych postanowiła zająć się w swojej pracy doktorskiej Pani mgr Gabriela Zielińska, która swoją pracę zrealizowała w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Benedykta Władyki.

Głównym celem pracy Doktorantki była identyfikacja oraz pełna charakterystyka biochemiczna zewnątrzkomórkowego enzymu proteolitycznego wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Microbacterium*, czyli proteazy MfpA. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie potencjalnych właściwości aplikacyjnych wydaje się jak najbardziej trafny i uzasadniony. Co więcej, promotor pracy, dr hab. Benedykt Władyka jest ekspertem w tego typu badaniach, co umożliwiło wykonanie pracy pod bardzo dobrym nadzorem merytorycznym.

Analiza bazy Scopus oraz Pubmed wykazuje, iż mgr Gabriela Zielińska jest autorem czterech prac opublikowanych w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Toxicon* - 2012; *Toxins* – 2016; *Pathogens and Disease* – 2018; *Scientific Reports* – 2019). Liczba cytowań publikacji z wyłączeniem autocytowań wynosi 38

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

(Scopus). Jest to dobry publikacyjny dorobek naukowy, który z pewnością ulegnie powiększeniu o wyniki zamieszczone w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Gabrieli Zielińskiej ma klasyczny układ i liczy 167 stron. Na wstępie pracy zamieszczony jest spis materiałów graficznych, który bardzo ułatwia poszukiwanie odpowiednich rysunków, tabel czy załączników. Wykaz stosowanych skrótów jest krótki, niemniej zawiera te kluczowe. Dobrym posunięciem było zamieszczanie rozwinięć dla związków organicznych w tekście dysertacji, gdyż umożliwia to ich szybką identyfikację w czasie czytania. Wstęp teoretyczny do pracy liczy 24 strony i został bardzo dobrze napisany. Pomimo dość skondensowanej formy, zawiera wszystkie merytoryczne informacje niezbędne do zrozumienia zasadności prowadzonych badań, a także postawienia hipotezy badawczej. Co więcej, sama lektura informacji zawarta we wstępie wskazuje na świetne rozpoznanie tematu przez Doktorantkę poprzez bardzo dobre dobranie cytowanej literatury. Poza kilkoma drobnymi literówkami, których przytaczanie uważam za nieistotne, tą część pracy oceniam wysoko.

Następnie, na dwóch stronach Doktorantka przedstawiła cele swojej pracy. Bardzo podoba mi się podzielenie tego rozdziału na dwie części. W pierwszej z nich Doktorantka przedstawiła genezę projektu, która został zapoczątkowany odkryciem fibrynolitycznych właściwości pożywki. To zaowocowało całym planem badawczym, którego tematyka stanowi treść przedstawionej rozprawy doktorskiej, a który to plan został przedstawiony w syntetycznej formie w części drugiej.

W rozdziałach Materiały (4 strony) i Metody (27 stron) mgr Zielińska przedstawiła wszystkie odczynniki oraz metody, a także techniki użyte w badaniach. Na szczególną uwagę zasługują Rysunki 3 i 4, które w bardzo przystępny sposób opisują schematy organizacji kluczowych eksperymentów. Bardzo pozytywnym aspektem prowadzonych prac w ramach doktoratu jest także fakt opisania wielu różnych stosowanych technik badawczych. Wskazuje to, iż Doktorantka w czasie prowadzenia badań mocno rozwinęła swój warsztat badawczy i była otwarta na nowe podejścia eksperymentalne. Co ważne, wszystkie eksperymenty w pracy opisane są w wyczerpujący sposób i klarownie, a ich powtórzenie przez niezależnego badacza nie byłoby problemem. Moja uwaga w rozdziale Materiały dotyczy nazewnictwa substratów użytych w badaniach. W przypadku analizy aktywności enzymatycznej bardziej poprawną i ogólnie przyjętą wersją jest użycie nazwy substraty chromogeniczne (w pracy używana nazwa to substraty chromogenne). Z kolei w substracie N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl jest literówka („a" powinno być α, co oznacza w tym przypadku zablokowaną grupę aminową w pozycji alfa, z kolei „Z" jest grupą blokująca i jej poprawne rozwinięcie to grupa benzyloksykarbonylowa). W rozdziale Metody moje pytanie

dotyczy eksperymentów opisanych na stronie 60, a dotyczących identyfikacji produktów degradacji fibrynogenu przez MfpA. Z czego wynikały długie czasy inkubacji fibrynogenu z MfpA, które wynosiły 5 i 120 minut (do degradacji Edmana) oraz 24 godzin (LC-MS)? Zastanawiająca jest zwłaszcza bardzo długa inkubacja przy analizie LC-MS. Czy rzeczywiście wymagany był tak długi czas? Czy przeprowadzono analizy wstępne przy krótszych czasach inkubacji? Mając na uwagę wysoką wydajność katalityczną proteaz można oczekiwać powstania produktów hydrolizy w znacznie krótszym czasie. Proszę tutaj o szerszy komentarz.

W rozdziale Wyniki liczącym 37 stron, Doktorantka w sposób rzeczowy przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Ich analiza przeprowadzona przez mgr Zielińską jest na wysokim poziomie merytorycznym, mają one także nowatorski charakter. Moje pytanie dotyczy tutaj analizy specyficzności substratowej. Doktorantka w wielu miejscach zaznacza, iż określiła specyficzność substratową proteazy MfpA. W klasycznym ujęciu przy analizie endopeptydaz za określenie specyficzności substratowej można uważać identyfikację kluczowych aminokwasów rozpoznawanych przez daną proteazę przede wszystkim w pozycjach P4-P1, a także zwykle P1`-P2`. Analiza Rysunku 21, na którym przedstawiono specyficzność substratową uzyskaną w wyniku trawienia fibrynogenu oraz insuliny można zauważyć, iż realne wyniki uzyskano wyłącznie dla pozycji P1`. Nie do końca wnioski odnośnie preferencji aminokwasowej można uzyskać dla pozostałych pozycji. Te wyniki nie są kompletne i z pewnością wymagają uzupełnienia poprzez przeprowadzenie eksperymentu jedną z alternatywnych metod (proteomika, PS-SCL, phage display czy inną). Co więcej, jak wspomniałem wcześniej. Długie czasy inkubacji substratów z enzymem mogą mieć zasadniczy wpływ na otrzymane preferencje i wskazane byłoby także przeprowadzenie pełnych badań kinetyki enzymatycznej przy różnych czasach hydrolizy, różnych stężeniach substratów czy enzymu. Ponadto użycie wyłącznie fibrynogenu i insuliny jako matrycy do określania specyficzności substratowej znacznie zawęża możliwość określenia dokładnych preferencji dla każdej z pozycji, tak jak jest to możliwe w przypadku wymienionych powyżej metod, w których wykorzystuje się mieszaniny kombinatoryczne. Otrzymany wynik profilowania specyficzności substratowej MfpA można uznać za specyficzność wobec fibrynogenu i insuliny, zdecydowanie jednak nie za ogólną specyficzność substratową tej proteazy w jej naturalnym środowisku.

W liczącym 27 stron rozdziale Dyskusja Doktorantka prowadzi analizę merytoryczną otrzymanych wyników przeprowadzonych eksperymentów. Ten rozdział jest bardzo dobrze napisany i dobrze się go czyta. Na szczególną uwagę zasługują bogate cytowania i omówienie wcześniejszej literatury tematu wskazujące, iż w ramach dysertacji otrzymano

wartościowy materiał badawczy o nowatorskim charakterze. Szczególnie cenne są informacje porównawcze MfpA z podobnymi enzymami już opisanymi w przeszłości. Widać, iż Doktorantka poświęciła bardzo dużo czasu temu zagadnieniu, co zaowocowało interesującą analizą porównawczą. Podoba mi się wyważona dyskusja Doktorantki na temat potencjalnego zastosowania proteazy MfpA w przemyśle. Analizując otrzymane wyniku wyraźnie wskazuje na słabe i mocne strony enzymu w aspekcie komercyjnych aplikacji. Widać, iż Doktorantka ma zmysł do praktycznego wykorzystania wyników badań podstawowych uzyskanych w czasie realizacji pracy doktorskiej. W tym rozdziale moje pytanie dotyczy prób inhibicji przy użyciu soli nieorganicznych ($CuCl_2$, $NiSO_4$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$). W jaki sposób taka inhibicja (stwierdzono jej brak w przypadku MfpA) miałaby zajść? Jedyne co można przypuszczać, to wymiana kationu w centrum aktywnym powodująca zwiększenie lub zmniejszenie aktywności enzymu, podobnie jak to obserwowano w przypadku wielu metaloproteaz. Niemniej, trudno tu oczekiwać klasycznej inhibicji kompetycyjnej, zwłaszcza mając na uwadze stężenia endogennych jonów w układach biologicznych.

Podsumowując, cel pracy został osiągnięty, praca posiada elementy nowości naukowej, a Doktorantka wykazała, że poprawnie i na wysokim poziomie merytorycznym potrafi interpretować otrzymane wyniki, a także jest dobrym eksperymentatorem posługującym się szerokim wachlarzem technik badawczych.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe opisane w pracy doktorskiej wykonanej przez mgr Gabrielę Zielińską uważam:

1. Otrzymanie aktywnej enzymatycznie proteazy MfpA produkowanej przez bakterie z rodzaju *Microbacterium*, co było podstawą prowadzenia badań w obrębie pracy doktorskiej
2. Udowodnienie, iż proteaza MfpA wykazuje właściwości fibrolityczne
3. Pełna charakterystyka sekwencji kodującej ORF MfpA oraz sekwencji aminokwasowej zewnątrzkomórkowej proteazy produkowanej przez *Microbacterium* sp. JK6B (CCUG 60266), a także przez inne szczepy *Microbacterium*
4. Sekwencjonowanie genomu *Microbacterium* sp. JK6B i analiza otoczenia sekwencji kodującej MfpA
5. Analiza selektywności miejsc hydrolizy MfpA w stosunku do fibrynogenu oraz insuliny, a także próba identyfikacji mechanizmu fibrynolitycznego działania MfpA
6. Badania nad rozpowszechnieniem genu *mfpA* w obrębie rodzaju *Microbacterium*

7. Próba udowodnienia patogennego wpływu bakterii *Microbacterium* spp. na nicienie *C. elegans*
8. Udowodnienie, iż MfpA hamuje tworzenie biofilmu *S. aureus*
9. Dokładna analiza porównawcza MfpA z innymi, już wcześniej opisanymi, podobnymi proteazami

Cześć literaturowa pracy liczy 236 pozycji uporządkowanych w sposób alfabetyczny według nazwiska pierwszego autora. Dużą część stanowią prace z ostatnich lat o charakterze oryginalnym. Doktorantka w dystertacji odnosi się często do prac źródłowych, unikając cytowania prac przeglądowych, co potwierdza jej dobrą znajomość literatury tematu. Uzupełnieniem pracy są rozdziały z wykazem użytych zasobów internetowych i programów badawczych, a także załączniki zawierające pełną dokumentację eksperymentalną w przypadku eksperymentów generujących dużą ilość danych, na przykład porównywanie sekwencji nukleotydowych czy poszukiwanie miejsc hydrolizy.

Pod względem stylistycznych praca jest napisana logicznie i starannie, ma bogatą i estetyczną szatą graficzną. Jest także wzbogacona kolorowymi rysunkami i schematami. Trudno dopatrzyć się w niej bardzo istotnych błędów językowych, natomiast ilość tak zwanych „literówek" czy sformułowań żargonowych jest niewielka.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Zielińskiej ma zdecydowanie nowatorski oraz oryginalny charakter. Otrzymane wyniki są na wysokim poziomie merytorycznym i mają cechy nowości naukowej. Główny cel badawczy, czyli szeroka charakterystyka biochemiczna proteazy MfpA produkowanej przez bakterie z rodzaju *Microbacterium* został osiągnięty i stanowi świetny punkt wyjściowy do dalszych badań. Zebrany materiał z pewnością może stanowić podstawę do napisania oryginalnej pracy naukowej, która zostanie opublikowana w czasopiśmie recenzowanym o zasięgu międzynarodowym. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją wysoką ocenę pracy. 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.

Marcin Drąg