



# Politechnika Wroclawska

prof. dr hab. Marcin Drag  
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania  
Politechnika Wroclawska  
Wyb. Wyspiańskiego 27  
50-370 Wroclaw  
tel. 071 320 4526  
e-mail: marcin.drag@pwr.edu.pl

Wroclaw, 28 lutego 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katherine Falkowski  
z Zakładu Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

**pt. „Analyzing the proteolytic network interactions of tissue kallikreins and  
matrix metalloproteinases”**

Enzymy proteolityczne od lat stanowią ciekawy obiekt badawczy ze względu na ich zaangażowanie w kontrolę niemal wszystkich ścieżek metabolicznych w organizmach żywych, jak również ich udział w rozwoju wielu chorób. Jednym z najbardziej gorących tematów badawczych w ostatnich latach w proteolizie jest wzajemne oddziaływanie różnych proteaz pomiędzy sobą w tej samej lokalizacji, a często również czasie. W przedstawionej do oceny pracy Doktorantka podjęła się próby wyjaśnienia szeregu takich ścieżek, a wartym podkreślenia jest fakt, iż dominujące obiekty badawcze w pracy, czyli kalikreiny oraz MMPs w ostatnich latach były uważane za „czarne owce” wśród proteaz, niemniej w ostatnim czasie ze względu na nowe odkrycia w zakresie ich funkcji stały się ponownie wdzięcznym obiektem badań. Praca została wykonana na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego, a jej promotorami byli prof. dr hab. Jan Potempa oraz dr Tomasz Kantyka posiadający bardzo duże doświadczenie w prowadzeniu tego typu badań.

Opublikowany dorobek naukowy Doktorantki stanowią cztery prace w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Journal of Biological Chemistry* (2016), *Scandinavian Journal of Reumatology* (2019) oraz dwukrotnie *International Journal of Molecular Sciences* (2019)). Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 122 strony i ma klasyczny układ, a także jest napisana w języku angielskim. W pierwszej części będącej wstępem teoretycznym Doktorantka w sposób wyczerpujący przedstawia zagadnienia będące przedmiotem postawienia hipotezy badawczej. Dokładnie opisuje budowę oraz zależności w macierzy zewnątrzkomórkowej, wszystkie badane proteazy i możliwe zależności pomiędzy nimi, a także ich do tej pory poznane funkcje jak również aspekty związane z dysregulacją prowadzące do różnych chorób. Wstęp czyta się bardzo dobrze i dostarcza on wszystkich niezbędnych informacji. Cytowana literatura została poprawnie dobrana, a dużą jej część stanowią oryginalne prace źródłowe. Całkowita liczba cytowań literaturowych oraz źródeł internetowych w pracy jest imponująca i wynosi 191. Z całą pewnością wstęp jest materiałem do napisania pracy przeglądowej, a zważając na obecnie intensywne badania w tym zakresie wielu grup badawczych, taka praca ma szansę spotkać się z dużym zainteresowaniem. Cel pracy, czyli zdolność kallikrein (KLK) do aktywacji proteinaz MMPs i aktywacji zymogenów KLKs za pośrednictwem gingipain został opisany jasno i precyzyjnie na jednej stronie w drugiej części dysertacji.

W kolejnych trzech rozdziałach (Materials; Rozdział 7, Methods; Rozdział 8 i Results; Rozdział 9) Doktorantka przedstawia wszystkie metody eksperymentalne użyte w pracy, a także opis eksperymentów i ich analizę. Analiza tej części dysertacji wskazuje, iż Doktorantka opanowała w czasie studiów doktoranckich bardzo szeroki wachlarz metod z zakresu biochemii, biologii molekularnej i biologii, a tym samym Jej badania można uznać za te o charakterze interdyscyplinarnym. Wykonane eksperymenty zostały przedstawione rzeczowo i dokładnie i bez problemu mogłyby zostać powtórzone przy wykorzystaniu opisów dysertacji. Wartość eksperymentalna zaprezentowanych nowych metod w pracy jest duża i oceniam ją wysoko. Przeprowadzone analizy wyników eksperymentalnych także są na bardzo wysokim poziomie merytorycznym. Bardzo podoba mi się tok rozumowania prowadzący do wyboru kolejnych eksperymentów prowadzących do udowodnienia hipotezy badawczej. Doktorantka w pierwszym etapie używa autorskiej technologii CleavEx opracowanej w laboratorium prof. Potempy do identyfikacji miejsc hydrolizy proMMPs przez KLKs, co prowadzi do wyłonienia kandydatów do dalszych badań. W kolejnym etapie prowadzi analizę aktywacji natywnych proMMPs wykorzystując syntetyczne substraty i zymografię, a ostatecznie prowadzi eksperymenty komórkowe w zakresie aktywacji

proMMP14 przez KLK14. Jest to naprawdę bardzo elegancki układ eksperymentalny i wskazuje na dojrzałość doktorantki oraz dużą wiedzę w zakresie planowania i prowadzenia eksperymentów. Moja uwaga dotyczy tutaj słowa „fluorescence” na stronie 41, które zostało tutaj niepoprawnie użyte. W przypadku opisu substratów poprawny zapis to „fluorogenic substrate”, zaś słowo „fluorescence” odnosi się do samego zjawiska fluorescencji. Z kolei na tej samej stronie w opisie substratu butyloxycarbonyl-Val-Pro-Arg-7-amido-4, brakuje *tert* przed butyloxycarbonyl. Z kolei na stronie 60 przy opisie eksperymentów kinetyki enzymatycznej używano dość wysokiego stężenia (10  $\mu$ M) substratów fluorogenicznych. Czym to zostało podyktowane i czy wartość ta jest poniżej  $K_m$  wobec badanych enzymów? Proszę również o wyjaśnienie dlaczego w przypadku kinetyki enzymatycznej opisanej w podrozdziale 8.24 na stronie 65 używano bardzo wysokich stężeń substratów (nawet 500  $\mu$ M). Struktura substratów wskazuje, iż mają one dość hydrofobowy charakter, a tym samym przy tak wysokim stężeniu w buforze można spodziewać się ich wytrącania. Czy przeprowadzono testy w zakresie rozpuszczalności tych substratów przed przeprowadzeniem eksperymentów kinetyki enzymatycznej? Proszę również o komentarz jak stężenia KLKs oraz proMMPs w bibliotece CleavEx (Figure 10), a także w późniejszych eksperymentach z wykorzystaniem tych enzymów odnoszą się do ich endogennych stężeń. Czy w ogóle znane są te wartości? Z kolei w zdaniu „Arginine-specific gingipain A, HRgpA, successfully hydrolyzed all of the sequences containing an arginine residue at the expected P1' site....” powinno być nie P1' a P1.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka w sposób dojrzały opisuje wyniki swoich badań, a także prowadzi dyskusję porównawczą w aspekcie już opublikowanych wyników. Analiza tego rodzaju pozwala z całą pewnością stwierdzić, iż dysertacja zawiera wiele wyników o wysokiej wartości naukowej i na bardzo dobrym poziomie merytorycznym. Wiele wyników ma zdecydowanie nowatorski charakter i otwiera całkowicie nowe kierunki badawcze. Szczególnie cenne w aspekcie całej pracy jest udowodnienie zdolności KLK14 do aktywacji MT1-MMP, a także późniejsze ich oddziaływanie. Ważną obserwacją jest także ta wskazująca na aktywację kalikrein przez gingipainy. Krytyczne podsumowanie swoich badań jest dowodem na dużą dojrzałość naukową Doktorantki, a poprawna analiza otrzymanych wyników w odniesieniu do założonych celów pracy jest dowodem na duże doświadczenie naukowe zdobyte w czasie wykonywania zadań badawczych. Na szczególne podkreślenie zasługują rysunki pokazujące zależności w badanych ścieżkach proteolitycznych. Śmiało mogę powiedzieć, iż otrzymane wyniki mają znamiona ważnego odkrycia naukowego, a przedstawiony w pracy materiał badawczy z pewnością ma szansę na publikację w czasopiśmie o dużym współczynniku oddziaływania.

Przedstawiona do oceny przez magister Katherinę Falkowski praca doktorska jest napisana w sposób jasny i przejrzysty. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów

językowych czy typograficznych, niemniej nie mają one negatywnego wpływu na wartość merytoryczną wyników.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Katherine Falkowski pod tytułem „Analyzing the proteolytic network interactions of tissue kallikreins and matrix metalloproteinases” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Zamieszczone tutaj uwagi i zastrzeżenia nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, bardzo dobry dorobek naukowy oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnoszę o wyróżnienie pracy odpowiednią nagrodą.

Wnoszę więc o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Katherine Falkowski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku  
prof. dr hab. Marcin Drąg

