



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Genetyki Bakterii  
dr hab. Renata Godlewska



Warszawa, 3 sierpnia 2022

**Recenzja pracy doktorskiej mgra Grzegorza Berety, pt.**

**„Analiza biochemiczna deiminazy peptydyloargininowej i jej rola w wirulencji *Porphyromonas gignivalis*”**

**wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,**

**pod kierunkiem prof. dra hab. Jana Potempy oraz dr hab. n. med. Katarzyny Gawron**

Zapalenie przyzębia (czyli paradontoza) jest jedną z najczęstszych chorób zapalnych. Szacuje się, że na całym świecie 538 milionów ludzi cierpi na poważną chorobę przyzębia, z czego 276 milionów straciło zęby. Oczekuje się, że liczby te będą rosły wraz ze wzrostem liczebności i starzeniem się populacji. Oprócz tego, że jest głównym czynnikiem powodującym utratę zębów, zapalenie przyzębia jest także powiązane z różnymi chorobami ogólnoustrojowymi, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroby sercowo-naczyniowe czy choroba Alzheimerera. Głównymi patogenami odpowiedzialnymi za rozwój i postęp przewlekłego zapalenia przyzębia są bakterie tzw. czerwonego kompleksu do którego zalicza się *P. gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannarella forsythia*, ale badania wykazują, że kluczową rolę pełni *P. gingivalis*. Dzięki różnym czynnikom wirulencji gatunek ten jest zdolny do manipulacji mechanizmami obronnymi gospodarza i wywołania dysbiozy mikrobioty jamy ustnej prowadzącej do rozwoju paradontozy. Praca doktorska mgra Grzegorza Berety dotyczy badania deiminazy peptydyloargininowej (w skrócie PPAD), uznawanej za jeden z czynników wirulencji *P. gingivalis*. U jej podstawy leży obserwacja, że gen kodujący PPAD jest zróżnicowany genetycznie i występuje w dwóch wariantach, nazwanych T1 i T2. Warianty różnią się występowaniem siedmiu mutacji punktowych, skutkujących zmianą trzech aminokwasów, zlokalizowanych w pobliżu centrum aktywnego enzymu (wariant T2).

Modelem badawczym w ocenianej rozprawie są dwa powszechnie stosowane szczepy laboratoryjne *P. gingivalis* ATCC 33277 i W83 kodujące wariant PPAD bez mutacji czyli T1. Doktorant wprowadzając punktowe mutacje w sekwencje genu *ppad* obu szczepów zmienił ich warianty z T1 na T2 i tym samym stworzył sobie model badawczy zapewniający niezmiennosc pozostałych czynników genetycznych, które mogłyby wpływać na aktywność biologiczną deiminazy. A właśnie analiza i porównanie aktywności obu wariantów deiminazy peptydyloargininowej oraz ich

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel.: 22 55 41 321, faks: 22 55 41 402  
e-mail: r.godlewska@uw.edu.pl  
<http://www.biol.uw.edu.pl>

wpływ na wirulencję szczepów *P. gingivalis* stanowi zasadniczy cel naukowy jaki Doktorant sformułował w rozprawie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim w formie spójnego tematycznie opracowania. Liczy 129 stron i została opatrzona 36 rycinami i 4 tabelami. Układ rozprawy jest prawidłowy – typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym, zawiera więc charakterystyczne dla takich opracowań rozdziały, tj. Streszczenie (również w języku angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz spis cytowanej literatury. W pracy zamieszczono także wykaz stosowanych skrótów oraz imponujący dorobek naukowy, na który składa się spis publikacji których współautorem jest Doktorant (tj. 11 artykułów i 1 rozdział w książce) oraz uzyskane granty (w liczbie 2).

Rozprawa jest napisana poprawnym specjalistycznym językiem polskim co zasługuje niewątpliwie na pochwałę. W kilku miejscach znalazłam drobne błędy i niezręczne określenia wynikające głównie z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego, np. powtarzające się „próbkę ładowano na złoże/kolumnę” (str. 48-50) czy białka sekrecjonowane zamiast wydzielane (str. 18). Ponadto wydaje mi się, że słowo muteina pojawiające się na str. 7, nie jest stosowane w języku polskim. Za to używany przez Doktoranta termin mikroflora (str. 14, 15, 23) funkcjonuje obecnie głównie w kontekście medycznym oraz języku potocznym, a w języku biologicznym powinniśmy je zastępować pojęciem mikrobiota.

#### Ocena poszczególnych rozdziałów rozprawy

Na początku rozprawy Doktorant umieścił *Wykaz stosowanych skrótów*, który ułatwia lekturę. Jednak nie wszystkie skróty zostały w nim ujęte. Przykładowo nie znalazłam stosowanego w tekście skrótu IC<sub>50</sub>.

Rozdział *Wstęp* obejmuje 14 stron rozprawy i zawiera 5 równocennych w hierarchii numeracji podrozdziałów, w których opisano kolejno: (1) zapalenie przyzębia jako jednostkę chorobową, częstość występowania i objawy kliniczne, (2) mikrobiotę płytki poddziąsłowej i rolę *P. gingivalis* w rozwoju procesów chorobowych, (3) mechanizmy wywoływania zapalenia przyzębia przez *P. gingivalis*, następnie (4) czynniki wirulencji, a w ostatnim (5) deiminazę peptydyloargininową PPAD z uwzględnieniem różnic i podobieństw do ludzkich enzymów o tej samej aktywności oraz udział w wywoływaniu zapalenia przyzębia oraz reumatoidalnego zapalenia stawów. Naturalnie najwięcej uwagi poświęcono czynnikom wirulencji, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka PPAD. Lektura wstępu pozostawiła jednak pewien niedosyt, gdyż w moim odczuciu niektóre zagadnienia zostały opisane dość pobieżnie. Zabrakło mi dokładniejszej charakterystyki samego obiektu badań, włącznie z podaniem klasyfikacji systematycznej. Także w opisie czynników wirulencji Doktorant skoncentrował się na gingipainach, fimbriach oraz deiminazie pomijając zagadnienia związane z problemem pozyskiwania żelaza, co w przypadku wielu bakterii patogennych, w tym także dla *P. gingivalis*, stanowi poważne wyzwanie. Ponadto we wstępie uwzględniłabym także, chociażby uproszczony i przedstawiony na schemacie, mechanizm katalizy deiminazy peptydyloargininowej oraz podrozdział dotyczący biologicznej roli cytrulinacji białek. Mimo powyższych uwag, należy podkreślić, że rozdział ten zawiera podstawowe informacje niezbędne do zrozumienia istoty problemu badawczego oraz uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Kolejny rozdział zawiera opis wykorzystanych w badaniach materiałów i metod. Zawarte w nim informacje pozwalają na powtórzenie najważniejszych eksperymentów, choć mam kilka uwag

krytycznych. Tabele zawierające spis szczepów bakteryjnych i plazmidów (1 i 2) powinny zawierać informacje dotyczące źródła pochodzenia tych materiałów. Nie wspomniano które z nich zostały „skonstruowane” przez Doktoranta, a które pochodzą np. z zasobów Zakładu Mikrobiologii UJ. Ponieważ w pracy pojawiają się szczepy z delecją genu *ppad*, a w metodach brak jest opisu sposobu ich otrzymania to zakładam, że pochodzą one z kolekcji macierzystej jednostki Doktoranta. W pracy nie znalazłam jednak żadnej informacji na ten temat. Nie znalazłam także informacji ile szczepów klinicznych przebadał Doktorant. Szczepy te, jak wynika z tabeli 1, pochodzą z kolekcji Zakładu Mikrobiologii IBBiB i są zapewne skatalogowane. Właściwe byłoby umieszczenie ich na przykład w osobnej tabeli. Niektóre doświadczenia są niedokładnie opisane, np. sposób wprowadzania izogenicznych mutacji w genom *P. gingivalis*. Szczegółowo opisano przygotowanie plazmidów do wprowadzania mutacji, ale przydałby się też opis mechanizmu podmiany wersji chromosomowej *ppad* na tę znajdującą się na plazmidzie. Również idea szczepu z wprowadzonym genem oporności na antybiotyki, stanowiącego kontrolę efektu polarnego nie jest w tym wypadku dla mnie jasna. Czy gen *ppad* wchodzi w skład operonu?

Rozdział *Wyniki* zawiera opis części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej. Ciąg eksperymentów został zaplanowany logicznie, z jasno postawionym celem. Jak już wspomniałam wcześniej, inspiracją skłaniającą do podjęcia badań była obserwacja, że gen kodujący PPAD *P. gingivalis* występuje w dwóch wariantach. Dzięki modyfikacji genetycznej dwóch modelowych szczepów *P. gingivalis* ATCC 33277 i W83 Doktorant uzyskał bliźniacze szczepy bakteryjne różniące się sekwencją genu *ppad* (ATCC 33277 T1 i T2 oraz W83 T1 i T2). Szczepy te i produkowana przez nie deiminaza peptydyloargininowa (a także warianty z dodatkowymi mutacjami) zostały wykorzystane do zasadniczych eksperymentów, których głównym celem było (1) porównanie aktywności oraz specyficzności enzymatycznej PPAD w różnych wariantach oraz z różnymi towarzyszącymi mutacjami punktowymi, (2) rozwiązanie struktury przestrzennej wariantu T2 ze związanym inhibitorem i porównanie jej ze strukturą ludzkiego PAD4, a także (3) porównanie wirulencji szczepów *P. gingivalis* kodujących warianty T1 i T2 w modelach *in vitro* i *in vivo*.

Do realizacji tych zadań Doktorant zastosował szereg adekwatnych i zróżnicowanych metod:

- (1) mikrobiologicznych (podstawowe metody hodowli mikroorganizmów);
- (2) genetycznych (Doktorant opracował w oparciu o zagnieżdżony PCR skuteczną metodę identyfikacji wariantów PPAD w szczepach klinicznych, przy użyciu mutageny specyficznej co do miejsca przygotowano różne warianty genu *ppad*, które następnie metodą wymiany alleli zostały wprowadzone do genomu *P. gingivalis*, a z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym przeprowadził analizę względnego poziomu ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji *P. gingivalis*);
- (3) biochemicznych (począwszy od na pozór prostego oczyszczania białek w różnych układach po charakterystykę biochemiczną i strukturalną deiminazy peptydyloargininowej obejmującą m.in. analizę kinetyki katalizowanej reakcji, analizę hamowania PPAD przez Cl-amidynę, wyznaczenie stałej wiązania substratu przez PPAD i wyznaczenie IC<sub>50</sub> czyli połowy maksymalnego stężenia hamującego inhibitora oraz analizę specyficzności enzymu przeprowadzoną przy użyciu metody HPLC);
- (4) bioinformatycznych (analiza sekwencji genów *ppad* oraz opracowanie drzewa filogenetycznego szczepów *P. gingivalis*);
- (5) metod wymagających pracy z liniami komórkowymi, które posłużyły do oceny inaktywacji EGF przez PPAD oraz do zbadania wpływu mutacji PPAD na ekspresję genów odpowiedzi prozapalnej aktywność oraz

(6) technik pracy ze zwierzętami (ocena wirulencji różnych szczepów *P. gingivalis* poprzez infekcje myszy i larw *Galleria melonella*).

Stosowanie tak rozmaitych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktoranta.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorant opisał na 31 stronach i przedstawił na 31 rycinach. Mam kilka pytań dotyczących tej części rozprawy:

- w pracy wykorzystano dwa powszechnie stosowane szczepy bakteryjne ATCC 33277 i W83, obydwa naturalnie kodujące wariant T1 PPAD. Co wiadomo o ich wirulencji? Poziom ekspresji badanych przez Doktoranta czynników wirulencji dość znacznie się różni w tych szczepach, czy wiadomo dlaczego? Dlaczego nie dołączono do tej analizy także szczepów ATCC 33277 i W83 kodujących wariant T2 PPAD?

- na rycinie 9B przedstawiono względną ekspresję mRNA *ppad* w mutantach w szczepie ATCC 33277. Analogiczne mutanty otrzymano także w szczepie W83. Dlaczego, oprócz szczepu W83 wt, nie zostały one dołączone do analizy?

- na Rycinie 10 przedstawiono zdjęcia obrazujące wyniki oczyszczania wariantów PPAD ze szczepów *P. gingivalis*. Obecność śladowych ilości białka w pożywce pozostającej po hodowli szczepów W83 Doktorant tłumaczy możliwą obecnością w próbce pęcherzyków błonowych, a co za tym idzie związanego z błonami białka PPAD. Czy w takim razie ATCC 33277 nie produkuje pęcherzyków, skoro w przypadku tego szczepu nie zaobserwowano tego efektu? Poza tym wydaje mi się, że zaledwie 8-krotne zagęszczenie supernatantu znad hodowli nie wystarczyłoby do uzyskania takiej ilości pęcherzyków. Tu chciałabym też przypomnieć, że stosowana przez Doktoranta metoda Western-blot nie jest metodą ilościową, a co najwyżej półilościową i to przy zachowaniu pewnych warunków;

- w teście specyficzności substratowej porównano między innymi aktywność PPAD T1 oraz rekombinowanego ludzkiego białka PAD4. Zaobserwowano nieopisywaną wcześniej aktywność egzodeiminazową enzymu PAD4. Czy jednak nie jest niepokojący brak aktywności endodeiminazowej tego białka? Czy jej brak nie stawia pod znakiem zapytania poprawności tego eksperymentu, np. w doborze substratowych peptydów?

- ekspresję genów prozapalnych *COX-2* i *mPGES-1* badano po infekcji pierwotnych ludzkich fibroblastów dziąsłowych szczepem *P. gingivalis* W83 oraz jego wariantami. Czym był podyktowany wybór tego szczepu. Dlaczego nie wykorzystano obu modelowych szczepów i ich wariantów od razu? Rozbicie tych eksperymentów na dwa etapy (z późniejszym dołączeniem wariantów szczepu ATCC 33277 m.in. z delecją genu *fimA*), powoduje trudności w interpretacji uzyskanych wyników (różnice w skali na wykresach) oraz w przeprowadzeniu analizy statystycznej. Jak wytłumaczyć lepszą stymulację szczepem ATCC C351AdFimA w porównaniu do szczepów niosących te mutacje osobno?

- wyniki uzyskane przez Doktoranta w badaniach wirulencji *P. gingivalis* przy użyciu larw *G. melonella* są dość zaskakujące i odbiegające od opublikowanych wyników innych autorów, np. przez T.A Santosa (2020), J. D. dos Santos (2017) czy Jose Soliati (2020). Opisują oni, że przy



zastosowanej przez Doktoranta dawce infekcyjnej ( $10^8$ ) śmiertelność larw sięga 100% już po 24 godzinach od iniekcji. Jak więc wyjaśnić te rozbieżności? Należy także zwrócić uwagę, że w cytowanej przez doktoranta pracy autorstwa Stobernack'a i wsp. zastosowano szczep W83 z delecją genu *ppad*, a nie jak w recenzowanej pracy, szczep produkujący deiminazę, ale w nieaktywnej formie. Na ten problem chciałabym generalnie zwrócić uwagę Doktorantowi. W wielu rodzajach eksperymentów używanie szczepu produkującego nieaktywne enzymatycznie białko jest zasadne i właściwe. Jednakże w badaniach dotyczących wirulencji bakterii bądź odpowiedzi obronnej gospodarza na infekcję dołączałabym, jako dodatkową kontrolę, szczep bakteryjny z całkowitą delecją badanego genu, w tym przypadku *ppad*, zwłaszcza że, jak wynika z opisu w pracy, Doktorant dysponował takimi mutantami w obu badanych szczepach. Zdarzyć się może, że obecność nawet nieaktywnego enzymatycznie białka będzie miała znaczenie w stymulacji układu odpornościowego gospodarza. Brak takiego wariantu może utrudnić interpretację wyników lub prowadzić do błędnych wniosków.

W *Dyskusji* przeprowadzono dokładną analizę uzyskanych wyników i krytycznie je omówiono z uwzględnieniem i wskazaniem zbliżonych rezultatów innych badaczy. Rozdział ten świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta i jego dogłębnej znajomości podjętej tematyki badawczej. Zacytowane w pracy piśmiennictwo zebrane w rozdziale *Literatura* obejmuje 145 odpowiednio dobranych i aktualnych pozycji.

Wnioski umieszczone w ostatnim rozdziale o tym z samym tytule uważam za merytorycznie poprawne.

Przedstawione w mojej recenzji uwagi, nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, a do najważniejszych jej osiągnięć niewątpliwie należy zaliczyć:

- 1) opracowanie prostej i skutecznej metody wykrywania wariantów genu *ppad* w materiale biologicznym, np. próbkach płynu kieszonkowego pobranego od pacjentów;
- 2) określenie różnic we właściwościach enzymatycznych pomiędzy wariantami PPAD T1 i T2 oraz wskazanie wpływu mutacji poszczególnych aminokwasów na aktywność białka. Należy podkreślić, że charakterystyka biochemiczna (wraz z rozwiązaną strukturą krystaliczną) oraz charakterystyka aktywności wariantu PPAD T2 zostały opublikowane w czasopiśmie *Protein Science*, a Doktorant jest pierwszym, równorzędnym autorem powstałej pracy. Zauważyłam także, że w kwietniu i maju tego roku zostały opublikowane jeszcze dwie prace zawierające wyniki zawarte w recenzowanej rozprawie, które nie zostały ujęte w prezentacji dorobku autora.
- 3) uzyskanie wyników poszerzających wiedzę na temat wpływu PPAD na wirulencję *P. gingivalis*.

W mojej opinii, przedstawiona praca stanowi wartościowe opracowanie, a jej wyniki wnoszą nowe treści do ogólnej wiedzy na temat deiminazy peptydyloargininowej *P. gingivalis* i jej wpływu na wirulencję tego mikroorganizmu. Jest to szczególnie istotne gdyż postępy w zrozumieniu mechanizmów patogenezы *Porphyromonas gingivalis* mogą przyczynić się do opracowania w przyszłości nowych strategii eradykacji tego patogena i skuteczniejszego leczenia chorób przyzębia.

Podsumowując, badania przedstawione w recenzowanej rozprawie są nowatorskie, wykonane z zastosowaniem odpowiednio dobranych metod, a sama rozprawa stanowi spójną merytorycznie całość. Pragnę też wyraźnie zaznaczyć, że nieliczne krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie wpływają na moją wysoką ocenę całości rozprawy przedłożonej mi do recenzji.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgra Grzegorza Pawła Berety** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgra Grzegorza Pawła Berety** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Renata Godlewska

