

**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, 12.07.2022 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Berety pt. „Analiza biochemiczna deiminazy peptydyloargininowej i jej rola w wirulencji *Porphyromonas gingivalis*”

Rozprawa doktorska mgr Grzegorza Berety została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii, na wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy oraz dr hab. n. med. Katarzyny Gawron. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktoranta wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób przyzębia, często korelujących ze schorzeniami układowymi o podłożu zapalnym, ze szczególnym uwzględnieniem jednego z kluczowych czynników etiologicznych tych chorób, czyli bakterii *Porphyromonas gingivalis*.

Rozprawa doktorska to 129 stron drukowanego tekstu wraz z rycinami i tabelami. Rozprawa jest kompletna, zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, spisem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Wstęp stanowi obszerne wprowadzenie do tematyki pracy badawczej, w którym autor przedstawia aktualny stan wiedzy obejmujący charakterystykę chorób przyzębia i opis czynników wirulencji produkowanych i wykorzystywanych przez bakterie *P. gingivalis*. W dalszej części teoretycznej pracy doktorskiej Doktorant szczegółowo opisuje deiminazy peptydyloargininowe (PAD), ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących deiminazy peptydyloargininowej produkowanej przez bakterie *P. gingivalis* (PPAD), uznawanej za jeden z czynników wirulencji tych bakterii, także w odniesieniu do chorób układowych o podłożu zapalnym. Kolejne rozdziały, Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusja przedstawione są w sposób przejrzysty, umożliwiając właściwą ocenę pracy doktorskiej. Piśmiennictwo obejmuje 155 pozycji literaturowych, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej była charakterystyka PPAD. Szczegółowe cele obejmowały badania nad przygotowaniem i analizą mutantów bakterii *P. gingivalis* pozbawionych aktywnego genu kodującego ten enzym, nadprodukcję i oczyszczanie wariantów białek PPAD i PAD4, porównanie aktywności i specyficzności wariantów PPAD,

analizę struktury przestrzennej PPAD w wariantcie T2 ze związanym inhibitorem i jego porównanie ze strukturą ludzkiego wariantu PAD4, analizę wpływu zwiększonej aktywności PPAD na wirulencję bakterii *P. gingivalis* w modelach *in vitro* i *in vivo*. Do realizacji założonego celu pracy doktorskiej mgr Grzegorz Bereta wykorzystał techniki biologii molekularnej, metody biochemiczne, metody mikroskopowe, krystalografię, badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych, a także badania *in vivo* przeprowadzone z wykorzystaniem modelu mysiego oraz modelu z zastosowaniem larw *Galleria mellonella*. Niektóre doświadczenia obejmowały aspekt kliniczny i przeprowadzone zostały z wykorzystaniem materiału od pacjentów. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane. Pod względem merytorycznym i edytorskim praca doktorska jest napisana bardzo dobrze, a bardzo nieliczne błędy nie wpływają na jej wartość merytoryczną.

W rozdziale Materiały i Metody mgr Grzegorz Bereta bardzo szczegółowo i w sposób przejrzysty przedstawił wykorzystane w pracy szczepy bakteryjne i linie komórkowe, plazmidy, startery, bufory, odczynniki, pożywki, materiały i sprzęt laboratoryjny. Zastosowane podczas realizacji pracy doktorskiej metody i techniki zostały opisane klarownie i wyczerpująco. Wykorzystanie interdyscyplinarnych metod i technik, m.in. z zakresu biologii molekularnej, preparatyki biochemicznej, enzymologii, mikrobiologii, hodowli bakteryjnych i komórkowych, mikroskopii, krystalografii, doświadczeń wykonanych z wykorzystaniem oczyszczonego białka natywnego i rekombinowanego, a także z zastosowaniem modeli *in vitro* oraz *in vivo*, świadczy nie tylko o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta, który do realizacji postawionych zadań potrafi sam 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 bardzo dobrze, w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Każdy z rozdziałów kończy się krótkim podsumowaniem, co ułatwia ogólną ocenę tak dużej liczby przedstawionych wyników. Jedynie niektóre opisy uzyskanych wyników i opisy rycin z takimi wynikami wydają się niepełne, co nieznacznie utrudnia ich ocenę osobom niezaznajomionym z metodami wykorzystanymi do ich uzyskania. Np. strona 82: „Test specyficzności mutantów PPAD przeprowadzono również wykorzystując peptydowe substraty oraz analizę ich modyfikacji techniką HPLC (Rycina 27)” oraz opis Ryciny 27: „W różnych punktach czasowych mierzono modyfikację substratu metodą HPLC”. Nie wiadomo jednak, jakie złożę/kolumnę ze złożem (a tym samym właściwą metodę) wykorzystano do rozdzielenia zmodyfikowanych peptydów techniką/metodą HPLC, a dodanie krótkiej informacji w tym

miejscu (a nie tylko w rozdziale Materiały i Metody) byłoby ułatwieniem dla czytającego. Opracowana przez Doktoranta metoda wykrywania wariantów genu *ppad* w materiale biologicznym (strona 62) wydaje się być czuła i swoista. Nie ma jednak w pracy wzmianki, czy uzyskane produkty zagnieżdżonego PCR (a przynajmniej wybrane próbki) poddano sekwencjonowaniu DNA w celu weryfikacji ich sekwencji. Także niektóre sformułowania są czasami niezręczne, np. strona 73 „W przypadku obydwu konstruktów otrzymano białko o zadowalającej czystości, co widoczne jest na żelu barwionym Coomassie blue.” Są to oczywiście tylko drobne niedoskonałości, które nie wpływają na wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a Recenzent wskazuje je tylko z obowiązku.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent zalicza szczegółową charakterystykę wariantów białka PPAD i ich porównanie z ludzkim wariantem PAD4, a także wykazanie znaczenia wariantów PPAD w wirulencji bakterii *P. gingivalis*. Na szczególną uwagę zdaniem Recenzenta zasługują następujące osiągnięcia:

- 1) wykazanie, że warianty PPAD T1 i T2 różnią się aktywnością katalityczną oraz wpływem na wirulencję szczepów bakterii *P. gingivalis*;
- 2) wykazanie wpływu reszt argininy i tyrozyny występujących w centrum katalitycznym PPAD na wiązanie substratu i aktywność katalityczną;
- 3) wykazanie, że warianty PPAD nie posiadają aktywności endodeiminazowej;
- 4) wykazanie, że PAD4 posiada aktywność egzodeiminazową;

Praca doktorska zawiera wiele cennych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw patogenności bakterii *P. gingivalis*. Część uzyskanych wyników również koryguje lub wyjaśnia dane opublikowane przez innych. Istotny jest także fakt, że część z tych wyników została już opublikowana, czyli została poddana dogłębnej ocenie przez specjalistycznych recenzentów renomowanych czasopism: *Protein Science* (IF=6,725), *Molecular Oral Microbiology* (IF=3,563), *Frontiers in Immunology* (IF=7,561).

W rozdziale Dyskusja Doktorant krytycznie ocenia uzyskane wyniki i ich potencjalne znaczenie, szeroko odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze, w tym do odmiennych lub kontrowersyjnych doniesień opublikowanych przez innych, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Całość pracy kończą krótkie, ale bardzo precyzyjnie przedstawione wnioski, w których Doktorant podsumowuje swoje osiągnięcia.

Pomimo przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników oraz dogłębnej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktoranta do pytań nasuwających

się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu poszerzenia dyskusji zawartej w pracy doktorskiej:

- 1) Jaki jest cel (oprócz badań podstawowych z zastosowaniem uproszczonego modelu układu immunologicznego) wykorzystania modelu larw *G. mellonella*, w którym bada się tylko odpowiedź nieswoistą w odniesieniu do patogenów człowieka ? Czy wyniki uzyskane w tak uproszczonym modelu mogą być wykorzystane np. do interpretacji odpowiedzi układu immunologicznego człowieka w schorzeniach z upośledzoną funkcją układu immunologicznego ? Czy może to mieć znaczenie w chorobach o podłożu autoimmunologicznym ?
- 2) Czy w badaniach lokalizacji PPAD analizowano frakcję zawierającą pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV) ? Na stronie 65 Doktorant pokazuje wyniki, a na stronie 96 zakłada: „Nie zaobserwowano uwalniania enzymu do pożywki hodowlanej. Wyjątkiem był słaby sygnał w zmutowanych szczepach w tle genetycznym szczepu W83, co może być wynikiem uwalniania dużej ilości pęcherzyków i fragmentów błony zewnętrznej do medium w tym szczepie.” Jeśli tak było, co może być tego przyczyną ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Grzegorza Berety nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 11 prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach naukowych oraz rozdział w podręczniku. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w pracy doktorskiej i 3 opublikowanych pracach, obejmujących część wyników zawartych w rozprawie doktorskiej, a także pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktoranta, niezwiązany ściśle z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Grzegorza Berety pod względem naukowym całkowicie spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Dlatego też, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz opublikowanie części wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Berety stosowną nagrodą.

