



prof. dr hab. Marcin Drag
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wroclawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ireny Waligórskiej

z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

**pt. „Charakterystyka bakteryjnych proteaz PepO z ludzkich periodontopatogenów
Porphyromonas gingivalis i *Tannerella forsythia*”**

Proteazy kontrolują niemalże wszystkie procesy życiowe w organizmach żywych. Są one także doskonałym celem w tworzeniu nowych terapii wobec licznych chorób cywilizacyjnych, bakteryjnych czy wirusowych, czego najlepszym przykładem jest stworzenie w ostatnim czasie inhibitorów proteazy SARS-CoV-2-Mpro, a tym samym skutecznej terapii wobec COVID-19. Zaakceptowanie tego leku przez FDA otworzyło całkiem nowy rozdział poszukiwania leków wobec proteaz bakteryjnych oraz wirusowych pokazując jak ważna jest wcześniejsza identyfikacja oraz walidacja celu biologicznego. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Ireny Waligórskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, a została wykonana pod opieką prof. dra hab. Jana Potempy (promotor) oraz dra Mirosława Książka (promotor pomocniczy) z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Głównym celem pracy magister Ireny Waligórskiej była dokładna biochemiczna oraz strukturalna charakterystyka proteaz PepO z dwóch ludzkich periodontopatogenów: *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia*, a także określenie ich lokalizacji subkomórkowej i funkcji w wirulencji tych bakterii. Taki wybór tematyki badawczej w aspekcie poszukiwania nowych celów biologicznych w leczeniu paradontozy uważam za jak najbardziej trafny i uzasadniony.

Analiza bazy Pubmed wskazuje, iż mgr Irena Waligórska jest współautorką czterech publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Powyższy dorobek

naukowy oceniam wysoko, niemniej tematyka do tej pory opublikowanych prac wskazuje, iż główne tezy przedstawionej do oceny pracy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Ireny Waligórskiej ma klasyczny układ i liczy 119 stron. Wstęp do pracy poprzedza wykaz skrótów, a także abstrakty w języku polskim oraz angielskim.

Wstęp teoretyczny jest krótki, niemniej zawiera niezbędne informacje o enzymach proteolitycznych, paradontozie jako chorobie oraz powiązanych proteazach. Zacytowana literatura pochodzi w większości z oryginalnych prac, co jest dowodem na dobre rozeznanie Doktorantki w literaturze tematu. Wstęp teoretyczny, a w szczególności ostatnie doniesienia literaturowe o potencjalnym wpływie paradontozy na powstawanie innych, licznych chorób - wyjaśnia także genezę postawienia hipotezy badawczej rozprawy doktorskiej oraz postawienia celów badawczych wymaganych do jej udowodnienia.

Cel pracy został jasno sprecyzowany w kolejnym rozdziale rozprawy doktorskiej.

W rozdziale Materiały, mgr Waligórska przedstawia pełen wykaz wszystkich odczynników oraz aparatury użytych w prowadzonych badaniach. W kolejnym rozdziale Metody, opisane są dokładnie wszystkie techniki użyte do udowodnienia hipotezy badawczej. Ich ilość jest imponująca i dowodzi, iż Doktorantka w czasie studiów opanowała wiele technik laboratoryjnych. Co więcej, ich zróżnicowanie wskazuje, iż praca ma charakter wybitnie interdyscyplinarny i łączy ze sobą aspekty biochemii, biologii molekularnej oraz biologii. Dokładny opis użytej aparatury i odczynników, a także technik badawczych z pewnością pozwoli niezależnemu badaczowi na powtórzenie wszystkich eksperymentów.

W rozdziale Wyniki, Doktorantka przedstawia osiągnięcia prowadzonych badań naukowych. Prowadzona dyskusja w aspekcie już wcześniej znanych odkryć w tym zakresie jest dojrzała i na wysokim poziomie merytorycznym. Moje pytanie dotyczy aspektu określania specyficzności substratowej. Doktorantka użyła niewielkiej ilości potencjalnych substratów do określenia specyficzności substratowej i na podstawie tej analizy stwierdza, iż jedyną pozycją w której można zaobserwować selektywność jest P1'. Czy nie jest to zbyt wczesne stwierdzenie i czy nie wskazane byłoby przeprowadzenie bardziej rozległych badań proteomicznych? Z pewnością pozwoliłoby to na uzyskanie większej ilości danych, a tym samym zdecydowanie lepszą charakterystykę badanych proteaz. Z kolei, w przypadku badań znanych już inhibitorów wskazana byłaby ich analiza w aspekcie potencjalnego mechanizmu inhibicji. Inhibitory centrum aktywnego czy inhibitory allosteryczne mają całkiem inne parametry wiązania, a tym samym ich analiza w aspekcie przede wszystkim braku inhibicji w badanych proteazach umożliwiłaby lepsze zrozumienie tego mechanizmu. Zwłaszcza iż Doktorantce udało się otrzymać struktury krystaliczne obu proteaza, co

uwzględnić za bardzo ważne i znaczące osiągnięcie w pracy. Kolejne moje pytanie dotyczy aktywacji PgPepO przez jony cynku. Czy w świetle dostępnej struktury krystalicznej, Doktorantka próbowała analizy, który z atomów cynku w strukturze ma wpływ na ten wzrost i jaka jest tego przyczyna? Bardzo bym prosił Doktorantkę o ustosunkowanie się do tych pytań.

Zdecydowanie z największym zainteresowaniem przeczytałem rozdział Dyskusja, w którym mgr Waligórska w dojrzały sposób i na wysokim poziomie merytorycznym podsumowuje wszystkie wyniki swoich badań, ich wartość w aspekcie już dostępnej wcześniej wiedzy w tym zakresie, a także wskazuje na dalsze możliwe kierunki badawcze. Z pewnością Doktorantce udało się osiągnąć zamierzone cele badawcze, a otrzymane wyniki mają oryginalny oraz nowatorski charakter i posłużą wielu badaczom do kolejnych badań. Sama Doktorantka na końcu pracy wskazuje na potencjalne kierunki badawcze, które powinny być ich tematem.

Podsumowując, za najważniejsze odkrycia naukowe pracy doktorskiej magister Ireny Waligórskiej uważam:

1. Opracowanie wydajnej metody ekspresji, a także oczyszczania i otrzymywania w postaci katalitycznie aktywnej dwóch proteaz – PgPepO oraz TfPepO
2. Wykonanie rozległej analizy biochemicznej obu proteaz.
3. Otrzymanie struktur krystalograficznych PgPepO oraz TfPepO.
4. Analiza lokalizacji komórkowej PgPepO oraz TfPepO.
5. Określenie potencjalnej roli biologicznej PgPepO oraz TfPepO.

Podsumowując wartość merytoryczną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Ireny Waligórskiej, uważam iż otrzymane wyniki są bardzo ciekawe, o nowatorskim charakterze, a w wielu aspektach mają znamiona odkrycia naukowego. Jest to naprawdę solidne podłoże pod dalsze badania i dowodzi doskonałego warsztatu naukowego Doktorantki wyniesionego ze współpracy z bardzo doświadczonymi Promotorami. Z pewnością jest to materiał na jedną lub nawet dwie publikacje.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Ireny Waligórskiej została przygotowana bardzo starannie i estetycznie. W pracy zdarzają się błędy interpunkcyjne czy edytorskie, niemniej ich ilość jest nieduża i nie ma wpływu na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska magister Ireny Waligórskiej z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod tytułem „Charakterystyka bakteryjnych proteaz PepO z ludzkich periodontopatogenów Porphyromonas gingivalis i Tannarella forsythia” ma oryginalny oraz nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań mają zdecydowanie cechy nowości naukowej. Doktorantka w bardzo trafny sposób udowodniła postawioną hipotezę badawczą i zrealizowała zaplanowane cele badawcze. 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.

Wnoszę więc do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Ireny Waligórskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Marcin Drąg

