



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Prof. dr hab. Andrzej Gamian
ul. Chatubińskiego 10, 50-368 Wrocław
tel. (071)7841370, 7840084, fax: 7840085
e-mail: andrzej.gamian@umed.wroc.pl; <http://www.am.wroc.pl>

Wrocław, 27.04.2017r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Kędziora pt. „Analiza potencjału inhibicyjnego pałeczek *Yersinia enterocolitica* wobec proteaz cysteinowych z rodziny papainy” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Gutowicza

Proteazy należą do enzymów stosunkowo dobrze poznanych, lecz nadal intensywnie badanych ze względu na ich duże znaczenie w biologii i praktyce. To samo dotyczy proteazowych inhibitorów, które w dalszym ciągu stanowią poważne wyzwanie dla badaczy, w wielu aspektach, gdyż układy enzymów z inhibitorami i ich regulacje występują we wszystkich procesach życiowych. Poznanie mechanizmów działania inhibitorów proteaz pozwala więc na lepsze zrozumienie tych procesów biochemicznych. Proporcja inhibitora do proteazy jest też często ważnym wskaźnikiem prawidłowości danego zjawiska i analiza tej relacji stanowi ważny parametr diagnostyczny. W procesach zakażenia, zapalnych, odpornościowych rola inhibitorów proteaz, bakteryjnych i gospodarza, jest istotna, dlatego badania inhibitorów dostarczają także informacji przydatnych do celów diagnostycznych i do terapii. Badania te są niezwykle ważne dla chemii, biochemii, biologii i medycyny. Podjęty w tej pracy problem jest kontynuacją programu realizowanego w kierowanym przez Profesora Jana Gutowicza Zakładzie Fizykochemii Drobnoustrojów Instytutu Genetyki i Mikrobiologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Podjęty temat badań nad inhibitorami proteaz *Yersinia enterocolitica*, patogenów względnie wewnątrzkomórkowych, jest uzasadniony i aktualny wobec braku danych o wytwarzaniu takich inhibitorów przez pałeczki *Y. enterocolitica*, szczególnie wobec możliwej roli w chorobotwórczości tych drobnoustrojów i potencjalnego zastosowania w biotechnologii i medycynie.

Rozprawa ma układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych, typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 155 stron maszynopisu, w tym 31 rysunków i 6 tabel, 253 pozycje piśmiennictwa, ponadto wykaz stosowanych skrótów, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

We wstępie pracy, autor, po krótkim wprowadzeniu czytelnika w główne tezy pracy, omawia proteazy cysteinowe, ich mechanizmy katalizy, klasyfikację, po czym opisuje strukturę i właściwości proteaz cysteinowych z rodziny papainy, występowanie i znaczenie biologiczne oraz ich zastosowania. Następnie opisuje białkowe inhibitory proteaz cysteinowych bakterii, ich strukturę i właściwości, w szczególności jako czynniki wirulencji drobnoustrojów, by przejść do omawiania poszczególnych grup bakteryjnych inhibitorów białkowych. Dalej autor przedstawia inhibitory niskocząsteczkowe, ich strukturę i właściwości, po czym omawia poszczególne grupy bakteryjnych inhibitorów niskocząsteczkowych. Ostatnią część wstępu autor poświęcił charakterystyce *Yersinia enterocolitica*, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości patogennych i wytwarzanych przez te szczepy proteaz, by przejść do omówienia podstaw, na których oparto tezę o występowaniu inhibitorów proteaz w tych bakteriach. Wstęp pracy jest napisany zwięźle i czytelnie, jest dobrze skonstruowany i wszystkie jego części są przyporządkowane przedmiotowi badań.

Oceniana praca miała na celu wykazanie obecności inhibitora papainy jako proteazy cysteinowej poprzez określenie aktywności inhibitorowej w komórce, na jej powierzchni w płynie hodowlanym oraz wydzielenie i scharakteryzowanie cząsteczki inhibitora. Dotychczas bowiem istniały tylko skąpe dane na temat homologii genomowej.

Opis stosowanych materiałów, metod badań i eksperymentów jest poprawny, podany w sposób wyczerpujący, dobór metod jest trafny dla realizacji zadań. Autor zoptymalizował warunki kilku metod i procedur, co pozwoliło na uzyskanie bardzo dobrych wyników. Autor poddał analizom 20 szczepów *Y. enterocolitica* pochodzących z różnych narządów zakażonych świń. Poza procedurami hodowli bakterii i fibroblastów, przygotowano ich ekstrakty komórkowe. Aktywność proteaz cysteinowych oznaczano metodami fluorymetrycznymi. Autor użył trzech metod analizy oddziaływania inhibitora z proteazą, co pozwoliło upewnić się, że nie było efektu trawienia inhibitora przez proteazę. Inhibitory proteaz badano pod względem termostabilności, pH stabilności, po czym przeprowadzono szereg analiz biochemicznych celem scharakteryzowania aktywności inhibitorowej, w tym stosując kilka odmian zymografii, otrzymano także inhibitor używając immobilizowanej inaktywowanej papainy. Po rozdziale metodą elektroforezy SDS-PAGE inhibitor analizowano przy pomocy LC-MS/MS fragmentów trypsynowych i z wykorzystaniem metod bioinformatycznych i baz danych. Pytanie nasuwa się odnośnie badania termostabilności, czy uwzględniono ilość inhibitora pozostającego w osadzie po wirowaniu.

Wyniki uzyskane przedstawiono i opisano jasno i rzeczowo, zostały dobrze udokumentowane na rycinach i w tabelach. Najpierw autor wykazał, że ekstrakty komórkowe *Y. enterocolitica* hamowały aktywność papainy i ludzkiej katepsyny L, ale nie wołowej katepsyny B, podczas gdy taką aktywność oznaczano u *E. coli* i *P. aeruginosa*. Taka selektywna aktywność inhibitorowa *Y. enterocolitica* była także wydzielana do pożywki oraz obecna na powierzchni komórek, przy czym inhibitory powierzchniowe były związane z komórką niekowalencyjnymi

oddziaływaniami hydrofobowymi i elektrostatycznymi. Wykazano, że inhibitory są termolabilne powyżej 40 °C i aktywne w 90% w zakresie pH 5-9, ponadto aktywność inhibitorowa była odwracalna. W dalszej kolejności autor wyizolował z ekstraktów patogennego szczepu *Y. enterocolitica* 4/O3, a także z klinicznego szczepu *E. coli* H64, inhibitor za pomocą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem inaktywowanej papainy. Główne białko inhibitorowe miało masę cząsteczkową około 18 kDa, przy czym chromatografia powinowactwa z immobilizowaną papainą lecz nieinaktywowaną nie pozwoliła otrzymać inhibitora. Trawienie inhibitora przez papainę było uzależnione od stężenia proteazy. Inhibitor *Y. enterocolitica* okazał się też inhibitorem katepsyn występujących w fibroblastach skóry linii NHDF. Przy pomocy analizy LC-MS/MS trypsynowanych fragmentów i bioinformatycznej wykazano, że inhibitor jest periplazmatycznym białkiem pomocniczym (chaperonem) Skp, uczestniczącym w fałdowaniu wirulentnych białek błony zewnętrznej u *Enterobacteriaceae*.

Dyskusja eksperymentów i wyników jest dobrze przeprowadzona w kolejnych częściach pracy, gdzie metody i wyniki są omówione krytycznie, są porównane do danych z piśmiennictwa. Poszczególne etapy pracy są rzeczowo uzasadniane, a konsekwentnie i logicznie wyciągane wnioski z kolejnych doświadczeń służą całościowej realizacji zamierzonego celu. Wyniki mają bardzo duże znaczenie dla poznania mechanizmów lokalnego zróżnicowania, swoistości tkankowej infekcji, gdyż inhibitory bakteryjne w sposób wybiórczy, swoście hamują różne proteazy. Autor pokazał, że szczep patogenny zawierał więcej inhibitorów na powierzchni komórki niż niepatogenny. Konsekwentne działanie autora pozwoliło od analiz aktywności inhibitorowej doprowadzić do wydzielenia inhibitora i określenia jego budowy. Nasuwa się pytanie, w jakim stopniu, w wyniku swoich badań, autor mógłby oszacować, że swoistość tkankowa infekcji zależy od specyficzności inhibitora.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, zaś kilka zaledwie uwag natury redakcyjnej zaznaczono na marginesie pracy i nie mają one znaczenia merytorycznego i nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Jedynie termin użyty na str. 101 i 105 podany, że papaina jest „zaadsorbowana” do agarozy, wydaje się być błędny, czy tutaj chodzi o niekowalencyjne jej wiązanie z żelazem. Termin immobilizowanej jest przyjęty i lepiej określa wiązanie białka z żelazem.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi nowe elementy do wiedzy o inhibitorach proteaz cysteinowych, mechanizmach patogenności *Yersinia enterocolitica*, co ma znaczenie dla opracowania nowych terapeutyków oraz możliwościach badań nad nowymi szczepionkami. Doktorant opanował wiele metod badań i analiz białek, wykazał się znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie wykorzystane, co dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu, interdyscyplinarnym z zakresu mikrobiologii, biologii, enzymologii i biochemii. Uzyskane wyniki mają znaczenie podstawowe oraz potencjalnie aplikacyjne.

Uważam, że rozprawa mgr Mateusza Kędziora zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595)

z późniejszymi zmianami, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Mateusza Kędziora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ
kierownik


prof. dr hab. Andrzej Gamian