



Wrocław 24.04.2017

dr hab. Barbara Żarowska
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Chelmońskiego 37
51-630 Wrocław

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Mateusza Kędziora pt. „Analiza potencjału inhibicyjnego
paleczek *Yersinia enterocolitica* wobec proteaz cysteinowych z rodziny papainy”**

wykonanej w Zakładzie Fizykochemii Drobnoustrojów Instytutu Genetyki i Mikrobiologii,
Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Jana
Gutowicza.

Dobór i znaczenie tematu

Proteazy cysteinowe cechują się dużą różnorodnością strukturalną i funkcjonalną. Biorą udział w wielu procesach fizjologicznych oraz patologicznych. Ich głównym zadaniem jest nieselektywna degradacja białek. Aktywują wiele proenzymów, prohormonów i neuroprzekazników. Uczestniczą w procesach zapłodnienia, rozwoju płodu, proliferacji oraz różnicowaniu się komórek. Przyczyniają się też do powstawania charakterystycznych zmian w komórce takich, jak np. reorganizacja cytoplazmy i chromatyny jądrowej. Pośredniczą w procesie apoptozy, degradacji lizosomalnej czy prezentacji antygeny. Mogą być także zaangażowane w wirulencję niektórych patogenów.

Spośród 11 klanów proteaz cysteinowych, wykazanych w bazie MEROPS the Peptidase Database (wydanie 11.0; <http://merops.sanger.ac.uk/>) najlepiej poznany i scharakteryzowany został klan CA, do którego należą są papainy i kalpainy, w tym katepsyny lizosomalne, zaliczane do proteinaz o największym znaczeniu dla organizmu ludzkiego.



Wiele przeprowadzonych badań potwierdziło istotny udział proteaz cysteinowych w rozwoju różnych stanów patologicznych, między innymi osteoporozy, zapalenia kości, reumatoidalnego zapalenia stawów, miażdżycy, dystrofii mięśniowej, cukrzycy oraz w procesach nowotworzenia i przerzutowania. Enzymy proteolityczne współdziałają ze sobą, prowadząc do degradacji struktur macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej otaczającej nowotwór, ułatwiając w ten sposób komórkom nowotworowym proliferację i rozsiewanie.

Aktywność wewnątrzustrojowych proteaz cysteinowych często podlega kontroli przez ich endogenne inhibitory, które zapewniają optymalny przebieg proteolizy, tym samym chroniąc organizm przed rozwojem stanów patologicznych. Z tego względu obserwuje się wzrost zainteresowania inhibitorami odpowiednich proteaz cysteinowych, w tym również pochodzenia mikrobiologicznego, które można wykorzystać do celów terapeutycznych. Podjęte więc przez mgr inż. Mateusza Kędziora badania zmierzające do określenia potencjału inhibicyjnego bakterii *Yersinia enterocolitica* wobec proteaz cysteinowych z rodziny papainy są w pełni uzasadnione, tym bardziej, że dotychczas nie wykazano by bakterie te produkowały jakiegokolwiek inhibitory proteaz cysteinowych. Praca ta ma więc duże znaczenie poznawcze, a potencjalny aspekt aplikacyjny inhibitorów proteaz cysteinowych w medycynie i biotechnologii stanowi dodatkowy atut podjętych badań.

Ocena formalnej strony pracy

Praca doktorska mgr inż. Mateusza Kędziora została przedłożona do recenzji w formie maszynopisu liczącego 155 stron wraz ze spisem literatury i stanowi typowe opracowanie o charakterze eksperymentalnym.

Układ pracy, poza wykazem stosowanych w pracy skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz spisem literatury, obejmuje dodatkowo sześć rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. W pracy zamieszczono 5 tabel i 31 rysunków, z czego 22 rysunki stanowią dokumentacje wynikową. Cytowania własnych dokumentów i pozycji bibliograficznych w tekście pracy są prawidłowe. Szata graficzna pracy jest bardzo staranna i przejrzysta.



Wykaz literatury obejmuje 253 pozycje, które zostały zacytowane we wszystkich rozdziałach pracy. Z reguły dobrze ilustrują one podjęte zagadnienia badawcze, chociaż odnoszenie się do publikacji innych autorów w części wynikowej jest raczej niespotykane w pracach badawczych, w których odrębny rozdział stanowi dyskusja wyników. W tym miejscu chciałabym podkreślić bardzo staranne przygotowanie pracy pod względem poprawności językowej.

Ocena merytoryczna pracy

W obejmującym 35 stron Wstępie Autor przedstawił klasyfikację oraz mechanizmy działania proteaz cysteinowych, a także ich charakterystykę, ze szczególnym uwzględnieniem proteaz z rodziny papainy. Znaczna część tego rozdziału poświęcona została białkowym i niskocząsteczkowym inhibitorom proteaz cysteinowych pochodzenia bakteryjnego, w tym ich strukturze oraz właściwościom. Ostatnia część wstępu dotycząca charakterystyki bakterii *Yersinia enterocolitica*, ich właściwości patogennych oraz wytwarzanych przez nie proteaz cysteinowych. Wskazanie czynników, przemawiających za możliwością produkcji przez te bakterie inhibitorów proteaz cysteinowych w sposób przekonywujący uzasadnia celowość podjętych badań. Bez wątpienia, część teoretyczna rozprawy prezentuje bardzo dobry poziom merytoryczny i świadczy o znakomitej znajomości zagadnień związanych z tematem rozprawy. Warto również zaznaczyć, że Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym bardzo dobrej pracy przeglądowej pt. Microbial inhibitors of cysteine proteases opublikowanej w czasopiśmie Medical Microbiology and Immunology, której zakres m.in. obejmuje zagadnienia będące przedmiotem dysertacji.

Zamieszczony w kolejnym rozdziale cel pracy został sformułowany prawidłowo, a przedstawiona koncepcja rozwiązania problemu badawczego jest klarowna i nie budzi zastrzeżeń recenzenta. Autorowi należy się uznanie za szeroki zakres badań, które zostały opisane w części metodycznej rozprawy i świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktoranta. Zamieszczony w tym rozdziale opis przeprowadzonych eksperymentów jest bardzo precyzyjny i z całą pewnością pozwala na ich odtworzenie.



Kolejny rozdział rozprawy zatytułowany Wyniki został podzielony na sześć podrozdziałów. Część wynikowa pracy jest napisana z dbałością o jasność i precyzję poszczególnych etapów i kolejno uzyskiwanych wyników. W pierwszej części tego rozdziału przedstawiono wyniki skriningu 20 szczepów bakterii *Y. enterocolitica* pod kątem zdolności do inhibicji proteaz cysteinowych: papainy i katepsyny B. Następnie oceniano aktywność inhibicyjną ekstraktów bakteryjnych i płynów pochodzących uzyskanych z 4 wybranych szczepów bakterii względem papainy, katepsyny B i katepsyny L z uwzględnieniem wpływu rodzaju podłoża, temperatury i czasu hodowli bakterii na aktywność inhibicyjną uzyskanych preparatów. W dalszej części rozprawy opisano wyniki dotyczące wpływu różnego pH i temperatury na stabilność inhibicyjną ekstraktów bakteryjnych względem papainy i katepsyny L, wykazując ich termolabilność (traciły aktywność w temperaturze powyżej 40°C) i stabilność na poziomie 90% w zakresie pH 5-9 i na poziomie 60-80% w całym badanym zakresie odczynu środowiska 3-12. Ten podrozdział pracy Autor zatytułował „Stabilność inhibitorów proteaz cysteinowych”. Zdaniem recenzenta, w sytuacji kiedy badaniu poddaje się całe ekstrakty komórkowe, a nie oczyszczone enzymy bezpieczniej byłoby zastosować tytuł „Stabilność surowych preparatów inhibitorów proteaz cysteinowych”. Taka nomenklatura często stosowana jest w tematycznym anglojęzycznym piśmiennictwie jako „crude enzymes”.

W kolejnych etapach recenzowanej pracy omówiono wyniki dotyczące oszacowania wielkości cząstek inhibitorów proteaz cysteinowych, ich oddziaływanie z powierzchnią oraz odwracalność inhibicji proteaz cysteinowych przez ekstrakt z *Y. enterocolitica*. Wykazano, że każdy z badanych szczepów *Y. enterocolitica* produkował przynajmniej cztery inhibitory o różnych masach cząsteczkowych mieszczących się w zakresie od 34 do powyżej 120 kDa. W oparciu o szczep nr 19 *Y. enterocolitica* z bioserotypu 4/O:3 dowiedziono, że obecne na powierzchni komórek inhibitory papainy i katepsyny L były białkami peryferyjnymi, a powodowana mini inhibicja proteaz cysteinowych była procesem odwracalnym, co potwierdzono w trzech niezależnych eksperymentach (metoda wzrastającego stężenia inhibitora, metoda rozcieńczeń według protokołu Holt'a oraz metoda zymografii).

Końcowymi etapami pracy były izolacja, identyfikacja i charakterystyka potencjalnych inhibitorów proteaz cysteinowych wytwarzanych przez pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*:



patogeny szczep środowiskowy *Y. enterocolitica* 19 (4/O:3) i kliniczny szczep *E. coli* H64. Zastosowanie chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem inaktywowanej (S-karboksymetylowanej) papainy zaadsorbowanej do agarozowego złoża pozwoliło na izolację białek o masie cząsteczkowej poniżej 20 kDa, które, zidentyfikowano metodą LC-MS/MS jako homologi peryplazmatycznego chaperonu Skp. Pozwoliło to Autorowi z wysokim prawdopodobieństwem założyć, że chaperon ten jest potencjalnym inhibitorem proteaz cysteinowych. Ponadto, wykazał on, że eluat z białkiem Skp, hamuje aktywność katepsyn cysteinowych wytwarzanych przez ludzkie fibroblasty z linii NHDF.

Podsumowując tę część pracy chcę podkreślić, że mgr inż. Mateusz Kędzior wykonał obszerne badania, które opisał w sposób klarowny i zrozumiały. Na pochwałę zasługuje bardzo czytelna i staranna dokumentacja wyników ułatwiająca ich interpretację. W tym miejscu chcę zauważyć, że punkt 4.6.1 zatytułowany „Białkowy inhibitor proteaz cysteinowych z ekstraktów *Y. enterocolitica* i *E. coli*” sugeruje, że dopiero eksperymenty opisane w tej części pracy pozwoliły na określenie białkowego charakteru inhibitorów proteaz, a przecież został on dowiedziony już wcześniej, gdy zastosowano metodę zymografii odwróconej.

W obejmującym 15 stron rozdziale zatytułowanym Dyskusja Doktorant przeprowadził analizę uzyskanych wyników w odniesieniu do rezultatów opisanych w tematycznej literaturze. Dyskusja została przeprowadzona w sposób dojrzały, a Autor odnosił się do wszystkich etapów zamieszczonych w pracy badań.

W rozdziale Wnioski, zamieszczono 6 dobrze sformułowanych punktów, które w pełni odpowiadają na postawiony cel badań.

Zadaniem recenzenta jest wskazanie młodemu adeptowi nauki ewentualnych uchybień i nieścisłości zawartych w pracy. Przedstawiona do recenzji praca mgr. inż. Mateusza Kędziora nie pozwoliła jednak na dużą aktywność w tym względzie.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego. Posługując się dobrze dobranymi, nowoczesnymi



technikami eksperymentalnymi zebrał obszerne dane, które przedstawił w klarownej formie, stanowiącej cenne opracowanie. Jestem przekonana, że praca doktorska mgr. inż. Mateusza Kędziora pt. „Analiza potencjału inhibicyjnego pałeczek *Yersinia enterocolitica*” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych o dopuszczenie Pana mgr. inż. Mateusza Kędziora do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zarówno zakres wykonanych badań, dużą wartość naukową uzyskanych wyników oraz ponadprzeciętną formę opracowania dysertacji wnoszę o wyróżnienie pracy w sposób zwyczajowo przez Wysoką Radę przyjęty.

Zarowska