

**Dr hab. Izabela Sabala**

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej  
i Komórkowej w Warszawie

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

Polska Akademia Nauk

e-mail: [isabala@imdik.pan.pl](mailto:isabala@imdik.pan.pl)

Warszawa, 04.06.2021

**Ocena osiągnięcia naukowego „Analiza molekularna bakteriofagowych i bakteryjnych enzymów litycznych wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan”, aktywności naukowej, dydaktycznej i popularyzatorskiej dr Magdaleny Płotki w toku postępowania habilitacyjnego.**

Dr. Magdalena Płotka ukończyła studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego (UG) i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUM) uzyskując stopień magistra biotechnologii w 1999 roku. Po studiach doktoranckim na tym samym wydziale w roku 2007 uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii w oparciu o wyniki uzyskane w badaniach białkowych składników mitochondrialnego nukleoidu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Dalsze doświadczenia zawodowe dr Magdalena Płotka zdobywała w czasie stażu podoktorskiego na Uniwersytecie w Oksfordzie. Od roku 2012 związana jest z Katedrą Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego i właśnie z tego okresu pracy zawodowej dr Magdaleny Płotki pochodzą publikacje stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny w procedurze habilitacyjnej.

Ocena osiągnięcia naukowego

Na przedstawione osiągnięcie naukowe składa się pięć prac opublikowanych w latach 2014 – 2020 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) ze wskaźnikami cytowani pomiędzy 3,0 a 4,6 i punktacją MEiN 40 w poprzedniej kwalifikacji punktowej i 100-140 w obecnej. Według Web of Science publikacje te były dotychczas cytowane 63 razy. Habilitantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, a dodatkowo w trzech z nich autorem lub współautorem korespondencyjnym. Udział habilitantki w przygotowaniu poszczególnych publikacji został szczegółowo pisany i oceniony na 65-80%. Biorąc pod uwagę znaczną liczbę współautorów niektórych z tych publikacji wskazany udział Habilitantki mógłby wydawać się zawyżony, ale analiza oświadczeń współautorów całkowicie uzasadnia zadeklarowany wkład Habilitantki w przygotowanie wskazanych prac. Można więc z pełnym przekonaniem stwierdzić, że **habilitantka miała wiodący wkład w uzyskanie wyników i przygotowanie publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego.**

Przedstawienie wyników stanowiących osiągnięcie naukowe poprzedzone jest wyczerpującym wstępem, w którym zamieszczone zostało przekonujące uzasadnienie celowości podejmowanej przez habilitantkę tematyki badawczej. Jej nadrzędnym celem jest poszukiwanie enzymów o aktywności antybakteryjnej i zastosowania ich jako alternatywnej metody zwalczania bakterii patogennych, szczególnie tych opornych na antybiotyki. Obecne dane dotyczące problemu antybiotykooporności są bardzo niepokojące, a przewidywania WHO dotyczące skali problemu spowodowanego brakiem nowych antybiotyków i alternatywnych metod leczenia zakażeń bakteryjnych są alarmujące. Najtrudniejsza sytuacja dotyczy antybiotykoopornych bakterii Gram ujemnych, które obecnie stanowią grupę patogenów wymagających natychmiastowej interwencji badaczy w celu opracowania skutecznych metod ich zwalczania. Firmy farmaceutyczne drastycznie ograniczyły prace nad nowymi antybiotykami i coraz częściej powraca się do wcześniej zarzuconych alternatywnych metod, jak fagoterapia i intensywnie pracuje nad nieantybiotykowymi terapiami opartymi np. o bakteriolityczne działanie niektórych enzymów, głównie endolizyn pochodzenia fagowego. I to właśnie endolizyny są głównym bohaterem prac badawczych Habilitantki. Do tej pory scharakteryzowano wiele enzymów bakteriolitycznych, w szczególności tych, które niszczą bakterie Gram dodatnie. Niektóre z nich są już na zaawansowanym etapie badań klinicznych, ale prawdziwym wyzwaniem jest opracowanie skutecznych endolizyn przeciwko bakteriom Gram ujemnym, gdyż obecność zewnętrznej błony komórkowej uniemożliwia bezpośrednie dotarcie tych enzymów do peptydoglikanów znajdujących się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Habilitantka podejmując to wyzwanie wyizolowała i scharakteryzowała nowe endolizyny z fagów bakterii termofilnych i bakterii wpisując się tym samym w bardzo aktualną i potrzebną tematykę badawczą.

Odkrycie pierwszego z enzymów, Ph2119 z faga *Thermus scotoductus* MAT2119, poprzedzone było analizą bioinformatyczną genomu fagowego, dzięki której zidentyfikowano otwartą ramkę odczytu kodującą nową hydrolazę peptydoglikanową wykazującą tylko niewielkie podobieństwo do dotychczas scharakteryzowanych enzymów. Dalsze badania wykazały, że jest to amidaza trawiąca peptydoglikany *Thermus scotoductus*. Dokładna charakterystyka właściwości biochemicznych enzymu pozwoliła nie tylko na określenie optymalnych warunków jego działania, ale co niezmiernie istotne, wykazała zdolności enzymu do lizowania mezofilnych bakterii Gram ujemnych, w tym także ważnych patogenów z rodzaju *Escherichia*, *Salmonella* czy *Pseudomonas*. Mniej unikatową ze względu na pochodzenie, ale także niezmiernie ważną cechą enzymu jest jego termostabilność, która. Zawarte w publikacji wyniki pokazują cały przemyślany cykl badawczy, od analizy genomu w celu wskazania potencjalnych nowych enzymów litycznych, poprzez ich klonowanie, optymalizację produkcji i charakterystykę biochemiczną. Jest to bardzo dobry przykład scenariusza identyfikacji całkowicie nowych enzymów, takich jak opisana w publikacji pierwszej amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa typu 2 wyizolowanej z faga termofilnego.

Kolejne trzy publikacje poświęcone są pogłębionej charakterystyce kolejnego enzymu z bakteriofaga vB\_Tsc2631 infekującego komórki *Thermus scotoductus* i wykazującego wysokie podobieństwo sekwencyjne do wcześniej scharakteryzowanej amidazy Ph2119. Poza

charakterystyką zależności aktywności enzymu Ts2631 od pH i soli, dołączone zostały analizy wpływu jonów metali, w szczególności jonów cynku. Dokładniejszym badaniom została poddana cecha termostabilności enzymu. W celu określenia temperatury topnienia białka habilitantka nawiązała współpracę z innym zespołem, dzięki czemu miała okazję zapoznać się z nowymi metodami badawczymi, a jednocześnie w sposób pełniejszy opisać unikalne cechy charakteryzowanego białka i określić precyzyjnie wyjątkowo wysoką  $T_m$  badanego enzymu. Badania enzymu zostały poszerzone analizą znaczenia wybranych reszt aminokwasowych wokół katalitycznego wytypowanych na podstawie analizy porównawczej modelu struktury enzymu. Uzyskane poprzez celowaną mutagenezę punktową warianty enzymu z zaprojektowanymi substytucjami zostały poddane wszechstronnym analizom, które potwierdziły kluczowe znaczenie wybranych aminokwasów dla aktywności enzymu.

W kolejnej publikacji habilitantka daje odpowiedź na szereg interesujących pytań dotyczących mechanizmu działania endolizyny Ts2631: (i) w jaki sposób enzym ten wiąże się ze ścianami komórkowymi bakterii nie posiadając oddzielnej domeny wiążącej, często spotykanej w hydrolazach peptydoglikanowych, (ii) które reszty aminokwasowe są zaangażowane w ten proces, (iii) w jakiej formie występuje enzym w roztworze wodnym. Dzięki nawiązanej współpracy z krystalografami, Habilitantka mogła do swych analiz wykorzystać eksperymentalnie uzyskaną strukturę enzymu Ts2631, a była to pierwsza struktura endolizyny z faga termofilnego. Struktura Ts2631 została następnie wykorzystana do wytypowania kolejnych reszt aminokwasowych i zbadania ich znaczenia dla specyficzności i aktywności endolizyny TS2631. Dzięki przeprowadzonym badaniom możliwe było m.in. wskazanie reszt aminokwasowych ważnych nie tylko dla aktywności katalitycznej enzymu, ale także tych, które odgrywają zasadniczą rolę w wiązaniu peptydoglikanu. Umożliwiło to wyznaczenie obszarów białka ważnych dla tego procesu, co ważne także poza samym rowkiem substratowym. Wykorzystując uzyskane informacje i we współpracy z naukowcami z Polski i USA przygotowana została bardzo interesująca ilustracja kompleksowych oddziaływań pomiędzy endolizyną a modelem przestrzennym peptydoglikanu.

Wszystkie te badania pozwoliły na dogłębną charakterystykę enzymu Ts2631, poznanie jego właściwości, warunków optymalnego działania, co stanowiło doskonałe przygotowanie do kolejnych kroków podjętych przez Habilitantkę, a mianowicie badań nad możliwościami zastosowania endolizyny do eliminowania patogennych bakterii Gram ujemnych. Z własnego doświadczenia wiem, jak ważne jest bardzo dokładne poznanie białka dla jego właściwego wykorzystania aplikacyjnego. Wykazanie aktywności endolizyny w stosunku do antybiotykoopornych szczepów wybranych gatunków bakterii Gram ujemnych potwierdziło potencjał aplikacyjny enzymu, a zastosowanie dodatkowych czynników oddziaływujących na zewnętrzną membranę rozszerzyło spektrum jego działania. Jednocześnie włączenie do badań zaawansowanych analiz mikroskopowych pozwoliło na zaobserwowanie przebiegu procesu lizy komórek pod wpływem endolizyny Ts2631 i potwierdziło wcześniejsze wnioski dotyczące znaczenia wybranych elementów białka (peptydu N-terminalnego) w uzyskaniu efektu litycznego. Przeprowadzone analizy mikroskopowe wykazały podwójną funkcję endolizyny Ts2631, która nie tylko degraduje peptydoglikan, ale także destabilizuje błonę zewnętrzną.

Mając doświadczenie w izolacji i charakterystyce nowych enzymów, Habilitantka postanowiła poszukać genów kodujących podobne białka w genomach bakteryjnych, a konkretnie w Gram pozytywnym *Clostridium* i wybrał do dalszych badań enzym LysC. Choć wstępne wyniki zymograficzne wypadły pozytywnie, aktywność lityczna tego enzymu nie została potwierdzona w testach redukcji gęstości zawiesin bakteryjnych. Co więcej, substytucje aminokwasów w centrum i wokół centrum aktywnego miały tylko niewielki wpływ na aktywność enzymu. Wyniki te podważały wcześniej przyjęte założenie o aktywności bakteriolitycznej enzymu. Szukając wytłumaczenia dla obserwowanych efektów antibakteryjnych przy jednoczesnym braku aktywności bakteriolitycznej Habilitantka wykorzystowała ponownie nie tylko swoje dotychczasowe doświadczenie, ale także szereg nowych metod. Podobnie jak w poprzednich pracach, wsparcie specjalistów z różnych dziedzin i zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło na poznanie mechanizmu działania antibakteryjnego enzymu LysC. Okazało się, że podstawą aktywności antibakteryjnej białka LysC jest nie tyle enzymatyczna liza ścian komórkowych, co interakcje pomiędzy N-terminalnym peptydem białka LysC a membraną bakteryjną prowadzące do jej dezintegracji. Na podstawie tych wyników i w oparciu o sekwencję N-terminalnego fragmentu LysC powstał syntetyczny peptyd Intestinalina o właściwościach antibakteryjnych. Jest to doskonały przykład na bardzo kreatywne podejście Habilitantki do napotykanym w pracy badawczej pytań, Jej naukową dociekliwość i umiejętność dobierania odpowiednich metod w poszukiwaniu mechanizmów obserwowanych zjawisk.

Podsumowując, przedstawiony w głównym osiągnięciu naukowym zestaw publikacji jest spójny tematycznie i świadczy o dojrzałości naukowej Habilitantki. Osiągnięcie naukowe Habilitantki wnosi znaczący wkład do wiedzy na temat endolizyn fagowych i białek bakteryjnych o aktywności antibakteryjnej. Istotnym jest także fakt, że uzyskane wyniki mogą stanowić podstawy do praktycznego wykorzystania tej grupy białek w walce z antybiotykoopornością. Na szczególną uwagę zasługuje fakt włączania do badań różnorodnych metod, współpraca z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi i twórcze, dojrzałe podejście do podejmowanego problemu. W mojej opinii przedstawione osiągnięcie naukowe daje podstawy do nadania stopnia doktora habilitowanego.

#### Ocena aktywności naukowej

Poza pracami przedstawionymi w osiągnięciu naukowym Habilitantka była zaangażowana w realizację innych projektów, co zaowocowało współautorstwem w kilkunastu znaczących publikacjach. Ogólna ocena parametryczna dorobku Habilitantki jest jak najbardziej zadawalająca; sumaryczny współczynnik IF 14 publikacji Habilitantki wynosi 48,5 a ich punktacja ministerialna 1510. Publikacje te były dotychczas cytowane 125 razy a wskaźnik Hirscha dorobku publikacyjnego Habilitantki wynosi 8.

Uzyskane wyniki były prezentowane także na wielu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Należy docenić fakt prezentacji ustnych na konferencjach międzynarodowych, prezentacji na zaproszenie organizatorów oraz zaangażowania w komitetach organizacyjnych konferencji.

Habilitantka odbyła kilka staży w ośrodkach zagranicznych zdobywając doświadczenie w pracy w zespołach międzynarodowych i nawiązując utrzymywane do chwili obecnej cenne kontakty, np. z prof. Yvesem Briersem. Uczestnictwo w dużych projektach międzynarodowych dało Habilitantce możliwość prowadzenia badań interdyscyplinarnych, dostęp do unikatowej wiedzy i zasobów innych uczestników, pozwoliło na wymianę doświadczeń i było doskonałym poligonem do zdobycia umiejętności we współzarządzaniu projektami i organizacją wielozespołowej współpracy.

Wśród różnorodnych form aktywności zawodowej Habilitantki jest recenzowanie artykułów naukowych i wniosków grantowych, co świadczy o rozpoznawalności Habilitantki jako specjalisty w swojej dziedzinie. Z mojego doświadczenia wiem, że recenzowanie publikacji i wniosków grantowych jest bardzo cennym doświadczeniem i doskonałą szkołą pisania dobrych artykułów i aplikacji grantowych.

Nieco krytycznie można byłoby ocenić dotychczasowe doświadczenie Habilitantki jako lidera projektów. Do tej pory kierowała ona samodzielnie tylko działaniem naukowym finansowanym w programie Miniatura finansowanym przez NCN. Jednocześnie z opisu działalności naukowej i udziału w przygotowaniu poszczególnych publikacji wynika, że chociaż nie pełniła ona funkcji kierownika projektu, to zakres jej aktywności przy planowaniu badań, ich wykonaniu i analizie w dużej mierze obejmuje obowiązki kierownika projektu i świadczy o dużej samodzielności Habilitantki. Przedstawione we wniosku informacje upoważniają do stwierdzenia, że Habilitantka jest w pełni przygotowana do takich wyzwań. Fakt przyznania habilitantce finansowania projektu w konkursie OPUS20 (maj 2021) potwierdza słuszność tego wniosku. Z tytułu tego projektu wynika, że będzie on kontynuacją badań nad endolizynami i ich potencjalnymi zastosowaniami w zwalczaniu bakterii Gram ujemnych. Pierwsza pozycja na liście rankingowej tego konkursu świadczy o docenieniu przez recenzentów wniosku grantowego, tematyki zaproponowanych badań, jak i dotychczasowego dorobku Habilitantki.

#### Ocena współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym

W swojej dotychczasowej pracy Habilitantka brała czynny udział w edukowaniu studentów prowadząc ćwiczenia z mikrobiologii, ale była też aktywna w kontaktach z uczniami szkół podstawowych i ponadpodstawowych. Prowadziła wykłady w gimnazjach i liceach (cykle wykładów), była opiekunką stażystów zdobywających pierwsze naukowe doświadczenia w laboratorium i nadzorowała realizację projektów edukacyjnych gimnazjalistów i licealistów.

Ważnym aspektem w pracy badawczej Habilitantki są kontakty z firmami biotechnologicznymi. Celem nadrzędnym badań Habilitantki jest poszukiwanie nowych enzymów o właściwościach antybakteryjnych, które mogłyby stanowić alternatywę w stosunku do obecnie stosowanych metod eliminacji bakterii, w szczególności Gram ujemnych. Realizacja ostatnich projektów, w które zaangażowana była Habilitantka, wiązała się ze współpracą z kilkoma firmami biotechnologicznymi, zarówno polskimi jak i zagranicznymi. Jest to bardzo ważne doświadczenie, szczególnie w przypadku projektów o potencjale aplikacyjnym.

## Podsumowanie

Pozytywna ocena osiągnięcia naukowego dr Magdaleny Płotki oraz równie pozytywna opinia o pozostałej aktywności naukowej, dydaktycznej i popularyzatorskiej Habilitantki daje mi podstawy do stwierdzenia, że spełnia ona wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego określone w Ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 30 sierpnia 2018 r. Dr. Magdalena Płotka jest doświadczonym pracownikiem naukowym, wykazującym dużą samodzielność i kreatywność w prowadzeniu badań, których wyniki w sposób znaczący poszerzają wiedzę w dziedzinie badań nad nowymi enzymami i ich potencjalnym wykorzystaniem w zwalczaniu bakterii patogennych.

W związku z powyższym pozytywnie opiniuję wniosek o nadanie dr Magdalenie Płotce stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.



Dr hab. Izabela Sabata