

Dr hab. Izabela Sabała  
Pracownia Inżynierii Białek

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Morzywołek

### Charakterystyka enzymów litycznych z bakterii z rodzaju *Clostridium* wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Morzywołek została wykonana w Katedrze Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Kaczorowskiego.

W rozprawie przedstawiono wyniki badań nad czterema białkami pochodzącymi z bakterii z rodzaju *Clostridium*. Odkrycie tych białek było konsekwencją badań nad hydrolazami peptydoglikanowymi prowadzonych już od lat w Katedrze Mikrobiologii UG. Wyniki dotyczące jednego z białek zostały już opublikowane, a doktorantka jest pierwszą równorzędną współautorką publikacji: Morzywołek, A., Plotka, M., Kaczorowska, A.-K., i in., 2021. Novel lytic enzymes of prophage origin from *Clostridium botulinum* E3 Strain Alaska E43 with bactericidal activity against clostridial cells. *Int J Mol Sci* 22, 9536. Ponadto mgr Agnieszka Morzywołek znajduje się wśród autorów dwóch innych publikacji dotyczących charakterystyki nowych endolizyn.

Hydrolazy peptydoglikanowe skupiają uwagę badaczy z dwóch głównych powodów. Po pierwsze, jako niezmiernie różnorodne i ważne, a jednocześnie wciąż mało poznane enzymy biorące udział w wielu istotnych procesach życiowych bakterii, fagów, ale także organizmów eukariotycznych. Innym ważnym powodem zainteresowania tą grupą enzymów jest możliwość wykorzystania ich właściwości litycznych jako nowego podejścia w walce z bakteriami, także tymi antybiotykoopornymi.

Podjęcie badań prowadzonych przez mgr Agnieszkę Morzywołek, których wyniki prezentowane zostały w rozprawie, jest przekonująco uzasadnione tymi dwoma względami. We wstępie przedstawione zostały informacje na temat głównych bohaterów tej rozprawy: bakterii z rodzaju *Clostridium* i pochodzących z nich enzymów o unikalnych właściwościach litycznych. Szczególnie dużo uwagi poświęcone zostało przedstawieniu problemów medycznych wywołanych przez gatunki z tego rodzaju, zagadnieniom antybiotykooporności i możliwościom zastosowania hydrolaz peptydoglikanowych w zapobieganiu rozpowszechnianiu się tego niezmiernie groźnego zjawiska.

W sposób bardzo systematyczny i skrupulatny przedstawione zostały informacje na temat hydrolaz peptydoglikanowych, holin, jako białek towarzyszących endolizynom oraz eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan. Ta część pracy stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki prowadzonych badań i jest niezmiernie pomocna w umiejscowieniu celów pracy w kontekście

aktualnego stanu wiedzy i perspektyw wykorzystania uzyskanych informacji nie tylko do lepszego poznania tej grupy enzymów, ale także ich praktycznego wykorzystania. Rozdział poświęcony tym zagadnieniom przedstawia przykłady wykorzystania endolizyn opisane w literaturze oraz te nieliczne, które zostały już wprowadzone na rynek lub są na etapie badań klinicznych. Tak dogłębna i aktualna analiza świadczy o wiedzy na ten temat i zainteresowaniu doktorantki możliwościami praktycznego wykorzystania wyników prowadzonych przez nią badań podstawowych.

Cel pracy został zdefiniowany w sposób precyzyjny i dotyczył analizy właściwości nowych białek klostridialnych. Charakterystyka trzech nowych hydrolaz peptydoglikanowych miała posłużyć także do odpowiedzi na pytanie czy podobieństwo do białek eukariotycznych obserwowane na poziomie sekwencji aminokwasowej znajdzie odzwierciedlenie także w strukturze i właściwościach biologicznych. Precyzyjnie zostały też zdefiniowane szczegółowe zadania, dzięki którym cel pracy mógł być osiągnięty.

Rozdział dotyczący opisu materiałów i metod użytych w czasie prowadzonych badań został przygotowany poprawnie, co umożliwia zapoznanie się ze szczegółami wykonanych doświadczeń pozwalając na ocenę zastosowanej metodyki, przeprowadzania badań i analizy otrzymanych wyników. Niestety w kilku przypadkach nie ustrzeżono się pewnych niejasności, jak np. podając zakres badanego pH czy stężenia NaCl użytych do badania wpływu siły jonowej buforu na aktywność LysB (Rozdział 6.15). Nie jest też jednoznacznie wskazane czy stężenie enzymu (50 µg/ml) jest stężeniem końcowym czy stężeniem roztworu enzymu dodawanego do reakcji (Rozdział 6.15, 6.17). Z kolei, w rozdziale nt. zymografii podano informacje o ilości użytego enzymu tylko dla LysB, natomiast zabrakło informacji o ilości pozostałych enzymów (Rozdział 6.14).

Enzymy, których dotyczy niniejsza rozprawa, zostały wytypowane na podstawie podobieństwa sekwencyjnego do wcześniej charakteryzowanych przez zespół endolizyn z fagów infekujących bakterie *Thermus scotoductus*. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej do innych hydrolaz peptydoglikanowych wszystkie trzy enzymy zostały zakwalifikowane jako amidazy N-acetylmuramilo-L-alaninowe. Jednocześnie wykazywały one podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikany (PGRP).

Plan badania wytypowanych białek został przygotowany w przemyślany sposób umożliwiając zdobycie wielu ciekawych informacji już na etapie analiz *in silico*. Prace doświadczalne zostały poprzedzone wszechstronną analizą sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych wytypowanych białek oraz ich otoczenia. Dzięki temu zidentyfikowano i przeanalizowano sekwencję profaga w genomie *C. botulinum*, gdzie znaleziono nie tylko sekwencję badanej endolizyny LysB, ale także towarzyszącego jej białka HoIB, dla którego zaproponowano funkcję holiny. Analiza sekwencji aminokwasowej enzymu LysB, a w szczególności porównanie jej do wcześniej opisanych białek, pozwoliło na przypisanie enzymu do rodziny Ami-2 obejmującej enzymy przecinające wiązania pomiędzy łańcuchem cukrowym i peptydem mureinowym, wyznaczenie potencjalnych ligandów cynku znajdującego się w centrum aktywnym, oraz wskazanie innych aminokwasów, które mogłyby odgrywać ważną rolę w katalizie.

Podobne narzędzia informatyczne zostały wykorzystane do wstępnej analizy białek LysP i LysPS z *C. perfringers*, które także zostały zakwalifikowane jako amidazy z rodziny Ami-2. W tym przypadku nie stwierdzono powiązania z sekwencjami profagowymi. Co ciekawe okazało się, że te dwa białka pochodzące z odmiennych szczepów różnią się jedynie obecnością dodatkowego fragmentu na końcu N tworzącego domenę trans membranową.

Użycie prostych narzędzi informatycznych pozwoliło także na uzyskanie ciekawych informacji na temat budowy domenowej białek, obecności helis transmembranowych, obecności specyficznych motywów aminokwasowych oraz możliwej lokalizacji.

Znacząca część prezentowanych wyników dotyczy uzyskania oczyszczonych białek do dalszych prac badawczych. Dla wszystkich badanych białek prace te były prowadzone według tego samego planu obejmującego: klonowanie do wektorów ekspresyjnych poprzedzone optymalizacją użycia kodonów, nadprodukcję białek w *E. coli* i oczyszczanie z zastosowaniem chromatografii powinowactwa. Poszczególne etapy uzyskiwania białek rekombinowanych wymagały optymalizacji w celu osiągnięcia lepszej wydajności i jakości uzyskanych preparatów. Poza elementami, które są standardowo optymalizowane w takich doświadczeniach, jak np. temperatura, testowany był wpływ białek opiekuńczych na wydajność produkcji oraz rozpuszczalność i aktywność produkowanych białek rekombinowanych. Sprawdzone także wpływ miejsca przyłączenia znacznika histydynowego na aktywność enzymów.

Wyniki prezentowane w tej części pracy nie dostarczają zbyt wielu nowych informacji o właściwościach białek jako takich, co jednak nie umniejsza znaczenia tym pracom. Wręcz przeciwnie, jest to niezmiernie ważny element całości, warunek konieczny, dzięki któremu możliwe było przeprowadzenie wszechstronnej charakterystyki białek. Z opisu przeprowadzonych doświadczeń wynika, że dla wszystkich badanych białek stosowano te same schematy optymalizacji na poszczególnych etapach produkcji, jednak nie we wszystkich przypadkach dawały one pozytywne efekty. Z mojego doświadczenia wynika, że produkcja białek rekombinowanych jest procesem trudnym ze względu na swą nieprzewidywalność i wymaga bardzo indywidualnego podejścia dla każdego przypadku. ***Czy testowano jeszcze jakieś inne warunki w celu optymalizacji produkcji/rozpuszczalności poszczególnych białek, w szczególności białek LysP i LysPB? Jeśli nie, co według doktorantki warto byłoby jeszcze sprawdzić w celu otrzymania lepszej wydajności produkcji badanych amidaz?***

W przypadku prób produkcji białka HolB zaobserwowano niewielki spadek OD po indukcji, co zinterpretowano jako efekt toksyczności w stosunku do komórek *E. coli*. Białko LysP także powodowało spadek OD po indukcji, a mimo to udało się uzyskać dostateczne ilości białka do dalszych badań. Sam spadek OD był po indukcji produkcji białka HolB był raczej niewielki i nie koniecznie świadczy o silnej toksyczności nadprodukowanego białka. ***Czy mimo to podjęto próby wyizolowania białka HolB? Jeśli nie, proszę o zaproponowanie badań, które mogłyby doprowadzić do uzyskania rekombinowanego białka HolB?***

Do monitorowania efektów działania badanych enzymów doktorantka zastosowała kilka różnych metod: zymografię, testy spadku OD i obserwacje mikroskopowe, potwierdzając nie tylko samą aktywność enzymów, ale także jej efekty lityczny. Bardzo ciekawe doświadczenie zostało przeprowadzone dla eksperymentalnego potwierdzenia aktywności holiny dla białka HolB.

Aktywność każdej z amidaz sprawdzono w różnych warunkach pH i zróżnicowanej sile jonowej. W przypadku LysB stwierdzono hamowanie aktywności enzymu w obecności soli, podczas gdy białka LysP i LysPS potrzebowały tego składnika dla swej optymalnej aktywności.

***Chociaż na wstępie rozdziału 7.9 autorka pisze o badaniu aktywności enzymów w zakresie pH od 3 do 11, na rycinach ( 31, 32, 33) pokazano wyniki z węższego zakresu pH. Proszę o komentarz.***

Przy tak wyraźnej zależności aktywności od siły jonowej zasadnym byłoby sprawdzenie wpływu pH stosując bufor o zbliżonej, niskiej sile jonowej, tak aby móc oddzielić wpływ tych dwóch czynników (pH i siły jonowej) na aktywność LysB.

**Zgodnie z danymi przedstawionymi na Rys. 31 aktywność enzymu LysB spada wraz ze wzrostem siły jonowej buforu i już przy 2 mM stężeniu NaCl obniża się o połowę i zanika przy stężeniu 20mM NaCl. W publikacji Morzywołek et al., 2021 na Ryc.6 przedstawione są wyniki zależności aktywności LysB od siły jonowej w szerszym zakresie stężeń NaCl, ale różnią się one od wyników przedstawionych w rozprawie, np. aktywność enzymu w obecności 2mM NaCl spada tylko do ok. 80%, a przy 20mM NaCl utrzymuje się na poziomie ok. 50% w stosunku do aktywności w warunkach bez dodatku NaCl. Skąd wynikają te różnice?**

Wiedza na temat enzymów została wzbogacona dzięki wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych. Pozwoliły one na stworzenie modelu struktur badanych enzymów, a na ich podstawie wyznaczenie potencjalnego miejsca wiązania kwasu lipoteichojuowego, wskazanie aminokwasów biorących udział w tworzeniu centrum aktywnego, w tym koordynacji cynku katalitycznego. Informacje te zostały w sposób szczegółowy przeanalizowane w oparciu o dane literaturowe, a znaczenie wytypowanych aminokwasów potwierdzone eksperymentalnie. Opisane badania są kolejnym przykładem umiejętności wykorzystania przez doktorantkę dostępnej wiedzy i analiz bioinformatycznych do planowania prac eksperymentalnych.

**Kryteria wyboru aminokwasów ważnych dla aktywności badanych enzymów zostały w pełni podane. Nieco mniej miejsca poświęcono na uzasadnienie na jakiej podstawie wybrano aminokwasy, którymi podstawiano wytypowane reszty? Proszę o krótkie uzasadnienie tego wyboru.**

**Choć zasadniczo interpretacja wyników badania aktywności uzyskanych wariantów białek nie budzi wątpliwości, niektóre wnioski dotyczące efektów podstawiania reszt nie wydają się w pełni uzasadnione, jak np. stwierdzenie o spadku aktywności niektórych wariantów, podczas gdy według prezentowanych danych wykazywał one wciąż bardzo wysoką aktywność w stosunku do białka dzikiego np. LysP T199K, 96 +/- 10,4 %; LysPS H30N 99 +/- 3,6%. Biorąc pod uwagę odchylenia wynikające chociażby z pomiarów stężenia czy różnice w czystości poszczególnych preparatów, bardziej właściwym wnioskiem byłoby stwierdzenie, że te konkretne zmiany nie mają wpływu na aktywność enzymów. Zastosowanie prostych metod statystycznych pomogłoby w interpretacji takich wyników.**

Badając nowe enzymy konieczne jest znalezienie odpowiedniego substratu. Jest to szczególnym wyzwaniem w przypadku hydrolaz peptydoglikanowych ze względu na zróżnicowaną budowę samych peptydoglikanów i mnogość modyfikacji, którym mogą one podlegać. Aktywność badanych amidaz sprawdzono na kilku wytypowanych gatunkach bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, co pozwoliło na określenie ich specyficzności.

**Jakie mogą być podstawy specyficzności tych enzymów?, Jakie czynniki (składniki ścian komórkowych) mogą mieć wpływ na determinację tej specyficzności? Proszę o opinię na ten temat na podstawie literatury i własnych doświadczeń.**

**Dlaczego testy aktywności były przeprowadzone w buforach o różnym pH dla różnych gatunków bakterii i to pH, które według danych zaprezentowanych na Ryc.48 nie jest optymalne dla aktywności LysB?**

***W opisie ryc. 48 powtórzone są fragmenty dotyczące wykresów b i c.***

***Wyniki zymografii przedstawione na Ryc. 50a nie zgadzają się z podsumowaniem specyficzności w tabelce Ryc. 50c. Podobnie jest na Ryc. 52.***

W ostatnim rozdziale rozprawy doktorantka poddała pod dyskusję otrzymane wyniki i wyciągnięte z nich wnioski. Są one przedstawione w kontekście aktualnej, bogatej literatury, co świadczy o doskonałej znajomości podejmowanej tematyki i dojrzałości naukowej mgr Agnieszki Morzywołek.

W trakcie przygotowywania rozprawy doktorantka nie uniknęła pewnych niedociągnięć edytorskich. Na najważniejsze z nich, mogące wpłynąć na interpretację wyników, zwróciłam już wcześniej uwagę, zaś pozostałe nie wpływają w mojej opinii na ocenę merytoryczną pracy.

### **Wniosek końcowy**

W rozprawie doktorskiej mgr Agnieszki Morzywołek przedstawiono wyniki prac nad czterema białkami, od zidentyfikowania kodujących ich sekwencji, poprzez klonowanie i produkcję białek rekombinowanych po ich charakterystykę biochemiczną z elementami analizy strukturalnej. Tematyka przedstawionych badań jest spójna, a przedstawione wyniki w sposób znaczący wzbogacają naszą wiedzę na temat klostrydialnych białek litycznych.

Doktorantka w toku badań zadaje trafne pytania i szukając na nie odpowiedzi używa dobrze dobranych i bardzo różnorodnych narzędzi. Szczególnie cenne w mojej opinii jest stosowanie przemyślanych i zróżnicowanych metod badawczych oraz uzupełnianie prac eksperymentalnych analizami bioinformatycznymi.

Po wnikliwej analizie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 13 ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami; Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Morzywołek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Dr hab. Izabela Sabała**

*Sabała*  
Kierownik Pracowni Inżynierii Białek  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN  
02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5

*19.04.2022*