



Politechnika Łódźka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Dr hab. Anna Bujacz, prof. PŁ.

Instytut Biochemii Technicznej
Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź
Tel. 042-6314337, 042-6314394
e-mail: anna.bujacz@p.lodz.pl

Łódź, 26.08.2019 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Lipowskiej pt. „Structural and functional studies of selected enzymes from pathogenic bacteria”

Pani mgr Joanna Lipowska wykonywała pracę doktorską pod kierunkiem prof. Krzysztofa Lewińskiego, w grupie Biokrytalograficznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Temat pracy wywodzi się z Centrum Genomiki Strukturalnej Chorób Infekcyjnych (CSGID - *Center for Structural Genomics of Infectious Diseases*) i opisane w pracy badania były wykonane w większości w Laboratorium Profesora Władysława Minora na Uniwersytecie Virginia, w USA.

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej są badania strukturalne białek pochodzących z patogennych bakterii, które mogą stanowić cel dla projektowania leków przeciwko tym mikroorganizmom.

Praca ma układ zbliżony do klasycznego, ale opis badań i dyskusja nad poszczególnymi białkami umieszczone są w oddzielnych rozdziałach. Jest to nietypowe, ale uzasadnione, gdyż oprócz tego, że pochodzą z patogennych bakterii i mogą stanowić cele terapeutyczne, to należą do innych rodzin enzymów.

Praca podzielona jest na: wstęp, cel badań, metodologię i procedury eksperymentalne oraz rozdziały poświęcone poszczególnym, badanym białkom: dihydroorotazom z dwóch organizmów, peptydazie B, domenie kasety wiążącej ATP z transportera ABC, aldoketoreduktazie i białku o nieznannej funkcji. Każdy z rozdziałów opisujących pojedyncze białko zawiera opis badań eksperymentalnych, omówienie wyników i elementy dyskusji. Praca zakończona jest podsumowaniem i wnioskami oraz spisem odnośników literaturowych.

We wstępie opisane są interakcje organizmu człowieka z mikroorganizmami oraz historia odkrycia antybiotyków i ich wpływ na pojawienie się antybiotykoopornych szczepów bakterii. Kolejnymi poruszonymi zagadnieniami jest strategia zwalczania szczepów

antybiotykoopornych oraz udział Centrów Genomiki Strukturalnej w badaniach nad białkami mogącymi stanowić cel terapeutyczny.

Rozdział opisujący rozwój infrastruktury synchrotronowej i wpływ tych ośrodków na badania strukturalne jest luźno związany z tematyką pracy. Natomiast opis patogennych bakterii z których izolowano geny kodujące białka, będące obiektem badań niniejszej pracy doktorskiej, jak najbardziej dobrze pasuje do tematu.

Pierwszym z omawianych organizmów patogennych jest pałeczka dżumy *Yersinia pestis*. Szczep ten uważany był za wrażliwy na antybiotyki, jednakże okazało się, że pod koniec XX wieku wyizolowano i zidentyfikowano szczepy *Y. pestis* antybiotykooporne. Dżuma jest dość dobrze kontrolowana epidemiologicznie, ale ze względu na potencjalne zagrożenie użycia tego szczepu jako broni biologicznej badania nad nowymi lekami zwalczającymi go są jak najbardziej uzasadnione.

Drugim patogennym organizmem są bakterie cholery *Vibrio cholerae*, które atakują tylko ludzi. Horyzontalny transfer genów od innych bakterii spowodował, że pojawiły się antybiotykooporne szczepy tej bakterii, które stwarzają zagrożenie epidemiologiczne.

Trzecim omawianym organizmem jest *Klebsiella pneumoniae* - bakteria powodująca głównie zapalenie płuc, ale mogąca wywoływać również inne choroby w zależności od tego, w którym miejscu rozwinie się infekcja. Występuje ona naturalnie w glebie na powierzchni roślin, a także w układzie trawiennym ludzi i zwierząt. Bakteria ta nie jest niebezpieczna dla zdrowych osób, ale w przypadku osłabienia odporności może przybrać złośliwą postać, powodując poważne szkody w organizmie. Może wtedy prowadzić do takich chorób, jak: zapalenie płuc, zakażenie ran, problemy z pęcherzem moczowym, a nawet zakażenia ogólnoustrojowego, jak sepsa. Charakteryzuje się szybkim rozprzestrzenianiem, a choroba daje objawy dość późno od momentu zakażenia. Jest jedną z bakterii której szczepy wykształciły daleko idącą antybiotykooporność dlatego prace nad nowymi celami terapeutycznym są bardzo ważne.

Coxiella burnetii należy do gram-ujemnych proteobakterii i wywołuje gorączkę Q – bakteryjną, zakaźną chorobę owiec i bydła. U ludzi gorączka Q zwana jest zoonozą i uważana jest za jedną z najbardziej zakaźnych chorób na świecie, ponieważ do wywołania infekcji u osób podatnych może wystarczyć kontakt już z pojedynczą bakterią. Grupy zawodowo narażone to: hodowcy bydła, owiec, kóz, personel weterynaryjny i laboratoriów mikrobiologicznych, pracownicy rzeźni, a także mleczarni.

Gronkowiec złocisty - *Staphylococcus aureus* jest gram-dodatnią bakterią występująca w jamie nosowo-gardłowej oraz na skórze ludzi i zwierząt. Nosicielstwo występuje szczególnie często wśród personelu szpitalnego, co ma szczególne znaczenie dla szerzenia się zakażeń wewnątrzszpitalnych. Gronkowce wytwarzają termoodporną enterotoksynę w zakażonym produkcie spożywczym. Gronkowiec złocisty najczęściej

powoduje zakażenia ropne skóry (czyraki, jęczmień, ropnie, zastrzał), zakażenia układowe (zapalenie tchawicy, płuc, mięśnia sercowego, sepsa), lub zatrucia związane z produkcją toksyn.

Rozdział poświęcony metodologii rozpoczyna się od opisu systemu informacyjnego do gromadzenia i śledzenia danych dotyczących badań strukturalnych w projektach nad poszczególnymi białkami będącymi obiektami badań w Centrach Genomiki Strukturalnej. Konieczność utworzenia takiej bazy danych Lab Data Base w laboratorium Prof. Minora wynika z tego, że poszczególne etapy projektu wykonywane są nie tylko przez inne osoby w jednym zespole lecz również przez inne laboratoria rozrzucone po całym świecie. System ten obejmuje również automatyczną rejestrację eksperymentów krystalizacyjnych. Pośrednio świadczy to o tym, że doktorantka zaangażowana była tylko w niektóre etapy procesu wyznaczania struktury krystalicznej białek opisanych w pracy.

Kolejne podrozdziały w metodologii poświęcone są opisowi eksperymentów krystalizacyjnych i obejmują one: wysokowydajne procedury krystalizacyjne z użyciem robotów, opis zestawów krystalizacyjnych, użycie alternatywnego rezerwuaru i enzymów proteolitycznych. Następne rozdziały dotyczą optymalizacji eksperymentów krystalizacyjnych, szczepienia mikrozarodkowego i pomiaru stabilności termicznej. W rozdziale poświęconym komercyjnym zestawom krystalizacyjnym Doktorantka podaje nazwy, ale nie podaje ich składu, ani odnośników internetowych do ich składu.

W ostatnim rozdziale poświęconym metodom, Doktorantka opisuje badanie kinetyki reakcji katalizowanej przez aldoketoreduktazę z *Klebsiella pneumoniae* oraz testy na specyficzność substratową tego enzymu z użyciem ponad 80 potencjalnych substratów.

W rozdziale „Procedury eksperymentalne” są opisane: „klonowanie i transformacja szczepów bakteryjnych, „Ekspresja i oczyszczanie badanych białek, Krystalizacja, Eksperymenty dyfrakcyjne, Obróbka danych dyfrakcyjnych i udokładnianie struktur, Użycie macierzy mikrozarodkowej w krystalizacji aldoketoreduktazy oraz Opis badania specyficzności substratowych KpAKR. Ostatnim rozdziałem w opisie procedur jest „Homologiczne modelowanie białek, do wykorzystania w podstawieniu cząsteczkowym, a także otrzymania modeli białek, dla których nie powiodło się rozwiązanie struktur krystalicznych.

Opisy w tych rozdziałach są bardzo pobieżne i bardziej akcentują użyte oprogramowanie krystalograficzne niż opis samych eksperymentów – procedur. W paragrafie poświęconym rozwiązywaniu struktur Doktorantka wymienia dyfrakcję anomalną przy pojedynczej długości fali opartej na selenie, z wykorzystaniem selenometioninowej pochodnej białka, jako standardową procedurę. Natomiast w opisie nadprodukcji białek nic nie wspomina o obecności selenometioniny w pożywce. Chciałabym aby Doktorantka uściśliła dla których białek używała pochodnej selenometioninowej i jak ją otrzymywała.

W kolejnych rozdziałach od V-IX omawiane są poszczególne białka, których określenie struktur przestrzennych jest celem tej pracy doktorskiej. We wszystkich tych rozdziałach zastosowano taki sam schemat opisu rozpoczynający się od wprowadzenia, rezultatów i dyskusji, które dalej podzielone są na: opis krystalizacji, rejestracji i obróbki danych dyfrakcyjnych, ogólny opis struktury i centrum aktywnego kończąc opisem o znaczeniu struktury w projektowaniu leków.

Pierwszymi z badanych białek przez Doktorantkę były dihydroorotazy – enzymy zaangażowane w transformację N-karbamiloasparagianu do kwasu 4,5-dihydrorotowego. Enzym ten bierze udział w syntezie pirymidyn we wszystkich organizmach żywych. Różnica między orotazami bakteryjnymi a orotazami organizmów wyższych polega na tym, że u bakterii enzym ten występuje pojedynczo, a np. u ssaków jest jednym z trzech białek wielofunkcyjnego kompleksu CAD, składającego się z syntetazy karbamilofosforanowej, transkarbamyazy asparaginanowej i właśnie dihydroorotazy. Różnice w budowie tych enzymów mogą stwarzać szanse dla selektywnego blokowania ich w patogennych bakteriach.

Doktorantka ustaliła strukturę krystaliczną dwóch dihydroorotaz z *Yersinia pestis* i *Vibrio cholerae* i zdeponowała w PDB pod kodami: 6CTY i 5VGM. Enzymy te są zależne od cynku i w centrum aktywnym białka znajdują się atomy Zn koordynowane przez atomy azotu pierścieni imidazolowych histydyn, grupę karboksylową kwasu asparaginowego i karboksylowaną lizynę i dodatkowo w 5 z 6 monomerach w strukturze YpDHO przez grupę karboksylową jabłczanu. Jon ten jako hydroksyanalog kwasu asparaginowego może naśladować wiązanie substratu. Sole kwasu jabłkowego były użyte do krystalizacji w formie racematu, a związanie jednego z enancjomerów (L) w centrum aktywnym enzymu świadczy o selektywnym wyborze enzymu, co nie jest przedyskutowane w pracy. Do potwierdzenia miejsca wiązania cynku Doktorantka zebrała dwa zestawy danych dyfrakcyjnych odpowiadające energii aktywacji cynku i poniżej progu energii, a piki na anomalnej mapie gęstości elektronowej jednoznacznie pokazały ich lokalizację (na str. 57 jest edycyjny błąd w wartości energii poniżej progu absorpcji). Na podstawie rozwiązanych struktur bakteryjnych dihydroorotaz Doktorantka dokonała modelowania orotazy z zarodźca malarii *Plasmodium falciparum*, dzięki któremu udowodniła, że struktura tego enzymu jest podobna do bakteryjnych dihydroorotaz typu II. Ze względu na strukturalne i funkcjonalne różnice pomiędzy ludzką, a bakteryjnymi orotazami, te ostatnie stanowią dobry cel do projektowania leków.

Kolejnym enzymem badanym strukturalnie przez Doktorantkę jest peptydaza B z *Yrstinia pestis*. Peptydazy B odcinają N-terminalną resztę aminokwasową z preferencją do kwasowych aminokwasów. Pomimo tego, że peptydaza B posiada szeroką specyfikę substratową, to największe znaczenie ma jej potencjalne zaangażowanie w metabolizm

glutationu. Autorka wykonała złożony proces optymalizacji warunków krystalizacji w celu poprawy właściwości dyfrakcyjnych kryształów, gdyż natywne białko nie formowało kryształów w wielu testowanych warunkach i dopiero próbka poddana kontrolowanej proteolizie ulegała krystalizacji. Użycie proteazy TEV i chemotrypsyny dawały najlepsze wyniki, ciągle jednak nie były to dobre rozdzielczości - około 4Å. Dopiero zastosowanie zarówno proteolizy podczas krystalizacji, jak i dodanie kationów cynku pozwoliło na uzyskanie kryształów rozpraszających do 2.75Å. Dane dyfrakcyjne z romboedrycznych kryształów zostały zindeksowane w heksagonalnym systemie H32. Białko to tworzy heksamer składający się z dwóch trimerów, a każdy z monomerów składa się z dwóch domen. Opis struktury zawiera sposób multimeryzacji, procentową zawartość arkuszy beta i α helis natomiast brakuje opisu trzeciorzędowej budowy monomeru. Bezpośrednio po opisie heksameru Doktorantka analizuje miejsce aktywne enzymu, w którym powinny być związane kationy metalu. Mimo, że w warunkach krystalizacyjnych znajdowały się jony cynku to nie związały się one w miejscu, gdzie w analogicznych peptydazach wiązały się kationy manganu. Może to wynikać z ograniczonej proteolizy i krystalizacji enzymu w nieaktywnej formie. Sposób wiązania kationów manganu został zaproponowany przez doktorantkę na podstawie homologicznego modelowania z użyciem struktury PDB ID: 3H8G, ale nic poza tym kodem i podobieństwem sekwencyjnym nie jest napisane na temat tego białka. Doktorantka dokonała porównania sekwencji z innymi homologicznymi peptydazami B, znajdując rejony zakonserwowane. Otrzymana struktura jest pierwszą peptydazą B zdeponowaną w PDB. Tabelki ze statystykami krystalograficznymi nie zostały umieszczone w pracy, ale otrzymałam je później jako suplement.

Kolejnym badanym w pracy białkiem jest kasetą wiążącą ATP w transporterze błonowym ABC, wielodomenowym białku transportującym różnorodne cząsteczki przez błonę komórkową. Rolą kasety ATP jest dostarczenie energii do tego transportu. W komórkach eukariotycznych ABC transporter służy do importu i eksportu cząsteczek sygnałowych. Natomiast w komórkach bakteryjnych jego główną funkcją jest dostarczanie składników odżywczych do wnętrza komórki. Wstępne dane dyfrakcyjne zostały zebrane do około 2.8Å, ale brak sygnału anomalnego od selenometioniny i brak homologicznego modelu do podstawienia cząsteczkowego uniemożliwiły rozwiązanie struktury. Optymalizacja procesu krystalizacji nieznacznie poprawiła rozdzielczość danych dyfrakcyjnych. Zastosowanie kontrolowanej proteolizy przy krystalizacji i dehydratacji powstałych kryształów umożliwiło zebranie danych dyfrakcyjnych do 2.6Å. Rozwiązanie struktury umożliwiło zastosowanie domeny wiążącej ATP z transportera maltozy z *Pyrococcus horikoshii* (PDB ID: 2IT1). Model do podstawienia cząsteczkowego był zmodyfikowany przez obcięcie pętli mogących stanowić różnice strukturalne pomiędzy modelem a rozwiązywanym białkiem. Podobnie, jak z poprzedniej struktury brakujące informacje na temat pomiaru i udokładnienia

znajdują się w tabeli w dołączonym suplemencie. Oprócz procentowej zawartości elementów drugorzędowych, tak jak w poprzedniej strukturze brak jest opisu struktury trzeciorzędowej białka. Mimo umiarkowanej rozdzielczości danych mapy gęstości elektronowej jednoznacznie wskazują na sposób związania ATP. Autorom struktury udało się odnaleźć acetylowaną lizynę w pozycji 139. Kształt mapy gęstości elektronowej wydaje się być przekonywującym co do zaproponowanej potranslacyjnej modyfikacji lizyny, ale przy rozdzielczości danych 2.6Å warto by to potwierdzić za pomocą innej metody np. hydrolizy i spektrometrii masowej peptydu zawierającego modyfikowany fragment. Autorka twierdzi, że acetylacja lizyny była poprzednio opisana w literaturze, ale nie podała odnośnika. W paragrafie opisującym znaczenie otrzymanej struktury doktorantka skupia się na modyfikacji lizyny natomiast dla mnie główną nowością naukową w tej strukturze jest możliwość porównania prokariotycznych i eukariotycznych ABC transporterów i możliwość poszukiwania cech je różnicujących.

Aldoketoreduktazy są enzymami redukującymi substraty posiadające grupy ketonowe lub aldehydowe do pierwszorzędowych i drugorzędowych alkoholi. Struktura ketoreduktazy z *Klebsiella pneumoniae* w kompleksie z NADPH została wcześniej określona w grupie prof. Minora. Doktorantka skupiła się nad wykrystalizowaniem formy apo oraz kompleksów z potencjalnymi substratami tego enzymu. Próby krystalizacji KpAKR w formie apo nie powiodły się, ale uzyskano inną formę krystalicznego kompleksu tego enzymu z NADPH. Doktorantka ponowiła próbę krystalizacji enzymu w formie holo, używając jako zarodków krystalizacyjnych zawiesinę kryształów kompleksu kpAKR/NADPH. W kilku warunkach uzyskała kryształy, ale miały one morfologię bardzo cienkich igieł bądź płytek i nie nadawały się do pomiaru dyfrakcyjnego. W związku z tym podjęła kolejne próby uzyskania kompleksów z kofaktorem i substratem. Kompleksy te chciała uzyskać na drodze kokrystalizacji lub namaczania i w niektórych przypadkach uzyskiwała mapy gęstości elektronowej lub zmianę koloru kryształów świadczące o zachodzeniu reakcji redukcji w kryształach, ale w żadnym z przypadków nie udało jej się uzyskać pełnej struktury. Jest to w pewnym sensie zrozumiałe, kompleksy z substratem uzyskuje się zwykle stosując nieaktywny mutant, ale trudno uzyskać nieaktywną formę enzymu dla enzymu z kofaktorem takim jak NADPH. Doktorantka zrekompensowała niepowodzenia w badaniach strukturalnych wyznaczając w testach kinetycznych preferencje substratowe badanego enzymu.

Dla hipotetycznego białka z *Staphylococcus aureus* udało się nadprodukcować i oczyścić preparat białkowy i uzyskać rozpraszające kryształy. Przy krótkim czasie naświetlania rozdzielczość danych dyfrakcyjnych była niska, a przy długim czasie ekspozycji dającym satysfakcjonującą dyfrakcję kryształy ulegały szybkiej degradacji. Autorka odnalazła najbardziej podobny sekwencyjnie homolog i wykonała modelowanie charakteryzując

strukturalnie białko. Model ten pozwala założyć, że badany enzym jest peptydazą podobną do M-16.

Praca opisuje badania strukturalne i biochemiczne bardzo interesującej grupy białek stanowiących potencjalne matryce w projektowaniu leków przeciw infekcjom wywołanym przez patogenne szczepy bakterii. Ze względu na zakres wykonanych badań, użyteczność wyznaczonych struktur i nowość naukową praca spełnia wymagania stawiane pracą doktorskim. Pośpiech w przygotowaniu rozprawy sprawia, że praca zawiera niedopowiedzenia, a niektóre aspekty badań mogłyby być przedstawione bardziej precyzyjnie. Jednak całościowo pracę oceniam pozytywnie i stwierdzam, że praca doktorska spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65 poz 595 z późniejszymi zmianami), oraz rozporządzeniem Ministra Edukacji Narodowej z 5 grudnia 2005 roku w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, w związku z czym z całym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Joanny Lipowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

