



Toruń, 19.08.2019

Prof. dr hab. Andrzej Wojtczak
Wydział Chemii UMK w Toruniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Joanny Lipowskiej
'Structural and functional studies of selected enzymes from pathogenic bacteria.'
przedłożonej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.**

Przesłana mi do oceny rozprawa magister Joanny Lipowskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Krzysztofa Lewińskiego. Inspiracją do badań objętych rozprawą było zjawisko lekooporności patogennych bakterii, a badania wpisują się w światowy wysiłek poszukiwania nowych, skutecznych terapii przeciwmikrobowych. Na obiekt badań wybrano odpowiedzialne za antybiotykooporność enzymy z patogennych szczepów *Yersinia pestis* (dżuma), *Vibrio cholerae* (cholera), *Coxiella burnetii* (gorączka Q), *Klebsiella pneumoniae* (lekooporne zapalenie płuc) oraz *Staphylococcus aureus* (infekcje szpitalne). Obiekty badań zostały wybrane na podstawie selekcji opracowanej przez Center for Structural Genomics of Infectious Diseases (CSGID).

Sformułowanym przez Doktorantkę celem badań było określenie strukturalnych i funkcjonalnych cech wybranych enzymów związanych z antybiotykoopornością patogennych bakterii. W szczególności celem badań było określenie struktury niebadanych dotychczas enzymów o niskiej homologii sekwencji do białek o znanych strukturach. Badania były prowadzone we współpracy z grupą Władka Minora z University of Virginia, USA. Doktorantka pracowała nad wszystkimi aspektami badań: prowadziła nadprodukcję białek, określała ich stabilność oraz stabilizujący efekt dodatków metodą TSA, krystalizowała białka m.in. stosując robot, rozwiązała struktury, a także przeprowadziła modelowanie przez homologię sekwencji.

Aspekty formalne. Przedłożona rozprawa jest związana z wieloautorską publikacją, która ukazała się w *Int. Journal of Biological Macromolecules*, **136**, 1176-89 (2019). Jest to jednocześnie wypełnienie wymogu opisanego w art. 11 ustawy o stopniach i tytule naukowym (DzU. 2016, poz 882 i 1311).

Oceniana rozprawa jest napisana w języku angielskim i liczy 118 stron, a bibliografia obejmuje 96 pozycji. Połowa objętości pracy to rozdziały zawierające Wyniki i Dyskusję. Należy zauważyć, że Doktorantka prowadziła ekspresję i krystalizację badanych białek i określiła ich strukturę. Dla peptydazy B *Yersinia pestis* Doktorantka określiła strukturę nieaktywnej formy enzymu, dlatego przeprowadziła dodatkowo modelowanie formy aktywnej w oparciu o homologię sekwencji. Dla aldo-keto reduktazy z *Klebsiella pneumoniae* Doktorantka nie uzyskała monokryształów nadających się do badań dyfrakcyjnych. Dla tego białka zostały przeprowadzone badania aktywności enzymatycznej przy użyciu skonstruowanej dla aldo-keto reduktaz biblioteki metabolitów. Dla białka SAOUHSC_01256 z *Staphylococcus aureus* otrzymane kryształy nie rozpraszały promieniowania w stopniu umożliwiającym analizę strukturalną i Doktorantka ograniczyła się do opracowania modelu homologicznego i na tej podstawie wysunęła hipotezę o przynależności tego białka i jego funkcji.

Najważniejsze wyniki i osiągnięcia.

1. Jednym z elementów badań było określenie struktury dihydroorotaz z pałeczki dżumy (*Y. pestis*) oraz przecinkowca cholery (*V. cholerae*). Te enzymy są elementem cyklu syntezy *de novo* pirymidyn.

Dla YpDHO otrzymanie kryształów wymagało użycia komercyjnych zestawów krystalizacyjnych, poszukiwania czynników stabilizujących enzym metodą Thermal Shift Assay, modyfikacji warunków krystalizacji przez dodanie $ZnCl_2$ w końcu optymalizacji składu rezerwuaru. Otrzymane kryształy dawały dyfrakcję do 2.4 Å. Mgr Lipowska rozwiązała problem fazowy metodą MR, jako model stosując strukturę enzymu z E.coli. Na podstawie widm fluorescencyjnych, a potem map uzyskanych z zastosowaniem sygnału anomalnego potwierdziła obecność 2 jonów Zn^{2+} w centrum katalitycznym. Struktura w części asymetrycznej zawiera 3 dimery DHO - sześć cząsteczek o prawie identycznej konformacji, z czego w pięciu cząsteczkach Doktorantka stwierdziła wiązanie reszt jabłczanów. Budowa białka odpowiada bakteryjnym DHO typu II, z domeną TIM oraz domeną tworzoną przez reszty N- i C-końcowe. Jest to typ najbardziej odległy od ludzkiej DHO, więc różnice mogą być wykorzystane do projektowania specyficznych leków antybakteryjnych. Mapy gęstości elektronowej wykazały m.in. obecność karboksylowanej lizyny (Kcx103) w centrum katalitycznym, a tak modyfikowana reszta jest typowa dla dihydroorotaz i jest ważnym czynnikiem nukleofilowym mostkującym jony Zn^{2+} . Porównanie wykazało, że wiązanie jabłczanu powoduje jedynie istotne zmiany konformacyjne długiej pętli i zamknięcie centrum katalitycznego, podobnie do EcDHO, a w cząsteczce nie wiążącej jabłczanu ta pętla jest nieuporządkowana.

Pytanie: W każdym z łańcuchów YpDHO brakuje kilku N- i C-końcowych reszt, co wynika z jakości map, a w domyśle ze zmiennej konformacji. Mając 6 identycznych podjednostek można było podjąć próbę uśrednienia gęstości elektronowej w nadziei na skompletowanie modelu. Czy Doktorantka tego próbowała.

Dla VcDHO proces krystalizacji objął użycie standardowych zestawów, następnie wybór dodatku metodą TSA, pełną optymalizację warunków krystalizacji, w końcu użycie pochodnych substratu i produktu reakcji. Uzyskane kryształy dawały dyfrakcję do 1.95 Å. Struktura została rozwiązana metodą MR z modelem YpDHO. Doktorantka stwierdziła obecność dimeru VcDHO w części asymetrycznej struktury podobnego do YpDHO, a mapy gęstości wykazały obecność S-oksocysteiny, i karboksylowanej lizyny mostkującej dwa jony cynku(II) w centrum katalitycznym. Miejsca aktywne obu podjednostek mają geometrię prawie identyczną ze stwierdzoną dla YpDHO (rmsd 0.2 Å), nie zawierają żadnego liganda, a długa pętla także wykazuje nieuporządkowanie.

Badane enzymy nie były dotychczas klasyfikowane. Dlatego Doktorantka przeprowadziła analizę podobieństwa sekwencji do kilku enzymów z superrodziny dihydroorotaz. Ta analiza wykazała wysoką identyczność sekwencji do EcDHO (YpDHO 72%, VcDHO 55%) oraz występowanie charakterystycznych motywów, potwierdzając możliwość zaklasyfikowania obu enzymów do bakteryjnych DHO typu II.

Bazując na 30% identyczności sekwencji do YpDHO, Doktorantka przeprowadziła modelowanie DHO z *Plasmodium falciparum*, pierwotniaka powodującego malarię. Dane literaturowe wskazywały, że ten enzym jest obiecującym celem terapii antymalarycznych i może być podobny do bakteryjnych DHO typu I i II. Modelowanie na serwerze Robetta doprowadziło do uzyskania sfałdowania i geometrii centrum aktywnego PfDHO podobnych do YpDHO. Nałożenie sekwencji obu wskazuje, że trudno oczekiwać innego wyniku.

Komentarz: Czy algorytm Robetty obejmuje dynamikę molekularną i analizę otoczenia aminokwasów w modelu? Biorąc pod uwagę wyjściowy model i obie sekwencje, należało oczekiwać podobnej architektury PfDHO i YpDHO. Hipoteza o podobieństwie mechanizmów reakcji jest prawdopodobną, ale hipotezą.

Najważniejszym aspektem przeprowadzonych badań jest wykazanie strukturalnej przynależności obu DHO związanych z lekoopornością do bakteryjnych DHO typu II, co oznacza istotne różnice w porównaniu z enzymem ludzkim. To daje możliwość projektowania leków specyficznych dla bakteryjnych DHO. Badania wskazały też kierunek projektowania leków - ligandów wiązanych do jonów cynku i reszt treoniny w centrum aktywnym i blokujących centrum aktywne przez zmiany konformacji długiej pętli.

2. Kolejnym obiektem badań była peptydaza B (PepB) z pałeczki dżumy. Białko należy do grupy aminopeptydaz leucynowych, i może być zaangażowane w wiele procesów, w tym w metabolizm glutationu. Znaczenie badań wynika z ograniczonej wiedzy o regulacji aktywności YpPepB. Optymalizacja warunków krystalizacji i trawienie białka trypsyną dała kryształy rozpraszające promieniowanie do 2.75 Å. Co ważne, krystalizacja była prowadzona z użyciem 1mM $ZnCl_2$, a roztwór białka był następnie zmieszany z roztworem zawierającym 0.2M siarczan amonu, pH 7.5. Próby rozwiązania struktury metodami SAD i MR nie powiodły się. Ostatecznie struktura została rozwiązana metodą MR z użyciem

modelu cytozolowej aminopeptydazy (PDB 3HJ3) z pomocą Marcina Cymborowskiego z laboratorium Władka Minora. Białko ma budowę homoheksameru zbudowanego z dwóch trimerów, a część asymetryczna zawiera 1 cząsteczkę białka. Doktorantka stwierdziła występowanie rejonów nieuporządkowanych, zlokalizowała 97% reszt w mapie gęstości elektronowej. W strukturze Doktorantka nie obserwowała obecności jonów metali w centrum aktywnym. Dlatego przeprowadziła modelowanie konformacji kluczowych reszt i położenia jonów Mn^{2+} w oparciu o strukturę leucynowej aminopeptydazy 3H8G. Porównanie sekwencji YpPepB i innych peptydaz wykazało, że reszty wiążące jony metalu są zachowane dla wszystkich analizowanych peptydaz. Także charakterystyczny dla PepB motyw CSATYRK związany ze specyficznnością substratową występuje w YpPepB. Podrodzina leucynowych aminopeptydaz jest słabo scharakteryzowana. Dlatego Doktorantka przeprowadziła analizę ewolucyjnego zachowania reszt w cząsteczce YpPepB, wykazując, że reszty rdzenia większej domeny tych peptydaz, w tym reszty centrum aktywnego, są wysoce zachowane w toku ewolucji. Najbardziej zmienne fragmenty są zlokalizowane w małej domenie N-terminalnej oraz na powierzchni większej domeny.

Określona struktura YpPepB jest pierwszą zdeponowaną w PDB strukturą superrodziny peptydaz B. Dlatego może ona być modelem do określenia struktur podobnych peptydaz metodą MR. Struktura daje wgląd w różnice między aktywną i nieaktywną (bez jonów metalu) formą enzymu. Znaczenie wykonanych badań wynika też z faktu oddziaływania PepB z innymi białkami – czynnikami transkrypcyjnymi i białkami regulatorowymi gospodarza. Poznanie struktury powierzchni YpPepB otwiera możliwości projektowania inhibitorów jego oddziaływań z białkami ludzkimi i w ten sposób pokonania lekooporności.

Pytanie: Proszę o interpretację, dlaczego po krystalizacji w użytych warunkach Doktorantka nie znalazła jonów cynku. Czy jest to tylko artefakt możliwego trawienia trypsyną?

3. Mgr określiła strukturę transportera ABC z *Coxiella brunetis*, hydrolazy należącej do superrodziny kaset wiążących ATP. To białko jest związane z transportem przez błonę komórkową. Transportery ABC są związane z lekoopornością przez ich zdolność transportu antymikrobowych leków poza komórkę, a także z opornością komórek nowotworowych na antybiotyki. Wieloetapowa optymalizacja warunków krystalizacji pozwoliła Doktorantce otrzymać kryształy dające dyfrakcję do ok. 2.8 Å. Słaby sygnał anomalny uniemożliwił rozwiązanie struktury metodą SAD. Próby metodą MR dla identyczności sekwencji z modelami 37-40% także zawiodły. Doktorantka rozwiązała strukturę z pomocą Marcina Cymborowskiego, stosując procedurę wycinania pętli z modelowej cząsteczki. Podobnie do innych transporterów ABC struktura zawiera w części asymetrycznej 2 cząsteczki o podobnej konformacji. W obu cząsteczkach znaleziono związane ATP i określono oddziaływania wiążące. Doktorantka stwierdziła N-acetylację Lys139, jedną z najczęstszych modyfikacji posttranslacyjnych ważną dla procesów sygnalizacji i odpowiedzi na stres.

Znaczenie określonej struktury wiązać można z faktem, że dotychczas nie było w PDB struktury homologicznego białka. Innym ważnym wynikiem jest zaobserwowanie acetylacji Lys, zgodnej z doniesieniami literaturowymi, lecz dotychczas nie obserwowanej w strukturach zdeponowanych w PDB.

4. Kolejną część rozprawy stanowi opis badań aldo-keto reduktazy z *Klebsiella pneumoniae*. Białka superrodziny aldo-keto reduktaz mają budowę baryłki TIM oraz zachowawcze centrum katalityczne z DYKH tetradą. Białka pełnią ważną rolę w biosyntezie i detoksyfikacji, katalizując zależną od NADPH redukcję grup karbonylowych substratów do alkoholi. Struktura badanego białka jest znana, i celem pracy było nawiązanie do jego funkcji fizjologicznej. Doktorantka otrzymała kryształy kompleksu KpAKR-NADPH oraz apo enzymu o jakości niedostatecznej dla eksperymentów. Kolejna grupa eksperymentów krystalizacyjnych była prowadzona dla różnych kombinacji apoKpAKR – NADPH – analog substratu, a Doktorantka wypróbowała 13 substratów i ich pochodnych, stosując współkrystalizację i nasączenie. W strukturze określonej dla najlepszych kryształów kompleksu z izatyną nie było związanych ligandów.

Struktura KpAKR została określona do 2.3 Å i jest bardzo podobna do struktury 4WGH zdeponowanej w PDB (rmsd 0.3 Å). W miejscu wiązania kofaktora Doktorantka zaobserwowała gęstość elektronową, ale niska rozdzielczość danych nie pozwoliła jednoznacznie określić, czy to forma zredukowana czy utleniona.

Mgr Lipowska przeprowadziła badania aktywności enzymatycznej używając biblioteki metabolitów dla aldo-keto reduktaz. Badania 9 istotnych biologicznie substratów aldo-keto reduktaz wykazały, że badany

enzym efektywnie katalizuje przemiany izatyny, benzaldehydu i pirogronianu sodu oraz ich pochodnych, wskazując na specyficzność substratową badanego enzymu.

Pytanie: na str. 95 Doktorantka uzasadnia brak gęstości elektronowej dla izatyny jej „szybką konwersją do substratu i następującym uwolnieniem z centrum aktywnego”. To określenie powtarza się na str. 101. Zapewne chodzi o transformację do produktu?

5. Mgr Lipowska przeprowadziła próby określenia struktury hipotetycznego białka SAOUHSC_01256 z bakterii *Staphylococcus aureus*. Nie jest znana funkcja tego białka, dlatego Doktorantka za cel postawiła określenie struktury i wydedukowanie funkcji na jej podstawie. W procesie optymalizacji otrzymane zostały kryształy dające dyfrakcję do 3.5 Å, ale te dane nie wystarczyły do określenia struktury. Model homologiczny wygenerowany na serwerze Robetta odpowiadał dimerowi badanego białka. Użycie przeszukania 3D-BLAST ujawniło, że najbliższe homologi badanego białka należą do superrodziny metalohydrolaz podobnych do LuxS/M16. Dodatkową przesłanką była obecność sekwencji HFLEH odpowiadającej zachowawczej sekwencji HxxEH z centrum aktywnego LuxS/M16. Przeprowadzona analiza sekwencji potwierdziła przynależność hipotetycznego białka do tej superrodziny. W PDB zdeponowana jest tylko jedna struktura peptydazy M16 (4XEA), i przy niskiej 34% identyczności sekwencji oba białka mają podobną strukturę przestrzenną.

Zastosowana analiza pozwoliła więc wnioskować, że hipotetyczne białko można zaklasyfikować do metalopeptydaz EC 3.4.24.X z superrodziny peptydaz podobnych do M16, i powiązać je z mitochondrialnymi peptydazami MPP.

Podsumowanie.

W mojej opinii przedstawiona mi do oceny praca jest bardzo dobra. Sygnalizowane powyżej pytania i komentarze mają tylko wskazać możliwe doprecyzowanie lub ułatwienie analizy pracy czytelnikowi, nie umniejszając w żaden sposób wysokiej oceny rozprawy. Zastosowane metody i uzyskane wyniki są spójne z postawionym celem badań. Połączenie metod eksperymentalnych z modelowaniem przez homologię jest skuteczne, dostarczając danych strukturalnych nawet w przypadkach trudnych. Imponuje wkład pracy Doktorantki w krystalizację i określanie struktur krystalicznych. Trzeba też pamiętać o rzetelnej pracy biochemicznej i nadprodukcji białka.

Rozprawa jest napisana starannie, prawie bez błędów, a zamieszczone rysunki współgrają z tekstem. Kilka zauważonych błędów nie wpłynęło na moją ocenę.

WNIOSEK KOŃCOWY.

Rozprawa magister Joanny Lipowskiej jest próbą zrozumienia strukturalnych podstaw lekooporności patogenów wybranych przez CSGID, co podnosi jej znaczenie. Otrzymane struktury wybranych białek dają asumpt do zrozumienia funkcji także tych enzymów, które wcześniej nie zostały scharakteryzowane. Wyniki tej pracy mogą pomóc zrozumieć mechanizmy działania badanych bakteryjnych enzymów, a w konsekwencji przyczynić się do rozwoju nowych terapii przeciwmikrobowych.

Biorąc wszystko pod uwagę stwierdzam, że rozprawa magister Joanny Lipowskiej spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2016 r., poz. 882 i 1311). Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania.

