

**Prof. dr hab. Grzegorz Bujacz**  
Politechnika Łódzka  
Instytut Biochemii Technicznej  
Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź  
Tel. 042-631-43-31  
Fax. 042-636-36-18  
e-mail: grzegorz.bujacz@p.lodz.pl

Łódź, 10.01.2019

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Bożeny Szelażek  
pt. „Analiza struktury i funkcji białek wirusowych: transglikozylazy P5  
z bakteriofaga  $\phi$  6 oraz białka nukleokapsydu ludzkiego koronawirusa NL63”**

Praca doktorska pani Bożeny Szelażek wykonana została w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką dr hab. Benedykta Władyki, a rolę konsultanta części krystalograficznej badań pełnił dr hab. Grzegorz Dubin. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska łączy badania funkcjonalne i strukturalne dwu białek pochodzących z bakteriofaga  $\phi$  6 i ludzkiego koronawirusa NL63. Pierwsze z białek, P5, jest enzymem o nieznanym w momencie rozpoczęcia badań mechanizmie reakcji, którego postulowaną rolą jest lokalne naruszenie integralności ściany komórkowej bakterii podczas infekcji bakteriofagowej. Drugie z białek jest dwudomenowe i co najmniej dwufunkcyjne, po pierwsze tworzy strukturę ściany nukleokapsydu, a po drugie strukturyzuje materiał genetyczny wewnątrz niego.

Praca doktorska jest napisana w języku polskim z załączonym krótkim streszczeniem i odpowiadającym mu abstraktem w języku angielskim. Podzielona jest na 6 głównych rozdziałów: Cele pracy, Wprowadzenie, Materiały, Metody, Wyniki i Dyskusja oraz Wnioski. Zawiera również Literaturę, spisy rysunków, tabel oraz listę publikacji autorki.

Część literaturowa pracy zatytułowana „Wprowadzenie” jest podzielona na dwie sekcje, pierwsza dotyczy historii biologii strukturalnej z akcentem na dominujące w tej dziedzinie badania krystalograficzne. Ten paragraf bez wątpienia oparty jest na publikacji Jaskólski M, Dauter Z, Wlodawer A. „A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits.” *FEBS J* 2014; 281:3985, z której autorka dokonała bardzo trafnej selekcji niezbędnych informacji. Druga część to „Krótki wstęp historyczny do wirusologii”, ta część bardzo mi pomogła w zrozumieniu całości pracy i umiejscowieniu prowadzonych badań w szerszym kontekście. Moje dotychczasowe zainteresowania naukowe w tym temacie ograniczały się do retrowirusów, a konkretniej do ich specyficznych enzymów stanowiących cel terapeutyczny w projektowaniu leków.

Głównymi zadaniami badawczymi opisywanymi w pracy jest charakterystyka strukturalna i funkcjonalna wybranych białek wirusowych. Dotyczą one dwu obiektów:

transglikozylazy P5 z bakteriofaga  $\phi$  6 oraz białka N nukleokapsydu ludzkiego  $\alpha$  koronawirusa NL63 (HCo NL63).

Gram – ujemna bakteria, *Pseudomonas syringae*, patogen wielu gatunków roślin uprawnych jest gospodarzem dla faga  $\phi$  6. Enzym P5 kodowany w jego materiale genetycznym wykazuje aktywność lityczną wobec ściany komórkowej gospodarza i innych Gram – ujemnych bakterii. Białko P5 w momencie rozpoczęcia badań nie miało potwierdzonej funkcji, wiadomo było jednak, że jest enzymem litycznym działającym na jeden z elementów ściany komórkowej. Wstępnie zostało zaklasyfikowane jako proteaza o niezdefiniowanym mechanizmie katalizy. Kolejną sugerowaną aktywnością była hydroliza wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego, analogiczna do lizozymu. Później jednak pojawiły się sugestie wskazujące, że białko to jest lityczną transglikozylazą, która degradowe wiązanie glikozydowe w tym samym miejscu, ale struktura produktów jest odmienna. Celem badań opisanych w rozprawie była charakterystyka białka P5 poprzez połączenie badań krystalograficznych z dogłębną analizą biochemiczną w celu wyznaczenia aktywności katalitycznej i mechanizmu działania. Uzyskana struktura krystaliczna jest podobna do litycznych transglikozylaz i w nieco mniejszym stopniu do lizozymu, co sugeruje, że P5 wykazuje jedną z dwu powyższych aktywności enzymatycznych i tym samym nie jest proteazą. Hydroliza substratów syntetycznych oraz wyizolowanych fragmentów ściany bakteryjnej pozwoliły na identyfikację otrzymanych produktów które okazały się związkami typowymi dla otrzymywanych w wyniku litycznej transglikozylacji. Tym samym wykazano, że P5 jest lityczną transglikozylazą. Wykonana przez doktorantkę kierunkowana mutageniza kluczowych reszt aminokwasowych i analiza aktywności enzymatycznej otrzymanych mutantów potwierdziła powyższą konkluzję. Za najbardziej cenne w tej części pracy uważam wyznaczenie struktury krystalicznej badanego białka z kompleksie z analogami substratów (NAG)<sub>5</sub> i (NAG)<sub>6</sub>. Wyznaczone struktury krystaliczne nie uwidaczniają gęstości elektronowej w kieszeniach wiążących ulokowanych w pobliżu centrum aktywnego, co sugeruje, że odpowiadają one strukturze kompleksu enzym-produkt. Mimo że do krystalizacji użyto dezaktywowanego mutantu E95A, to jego śladowa aktywność enzymatyczna przy długim czasie oddziaływania z analogiem ściany komórkowej pozwoliła na zajście reakcji. Struktury te wyjaśniają również jak polimorfizm pojedynczego nukleotydu, który powoduje występowanie dwu naturalnych mutein 124R i 124G, wpływa na wiązanie substratu lub produktu.

Białko P5 poza domeną katalityczną posiada nietypowe wydłużenia N- i C- końców. Pani Bożena Szelażek wykazała eksperymentalnie poprzez analizę aktywności szeregu mutantów punktowych, że część N-końcowa, jak i helisa C-końcowa uczestniczą w regulacji aktywności enzymu.

Część doktoratu, dotycząca badań krystalograficznych i biochemicznych białka P5, opisana jest w sposób bardzo logiczny, chociaż dość zwięzły i bardziej przypominający opis publikacyjny niż obszerny opis, typowy dla doktoratów w starym stylu. Niektóre informacje dostępne są tylko w formie odnośników. Szkoda, że nie pojawiło się porównanie sekwencyjne i strukturalne białka P5 z faga  $\phi$  6 z najbliższym homologicznie lizozymem i transglikozylazą. Takie porównanie ułatwiłoby odbiór tego projektu i mogłaby pojawić się na obronie. Kolejnym interesującym problemem jest odmienna architektura dimeru białka P5 w strukturze 4DQ5, która posłużyła jako model w podstawieniu cząsteczkowym, a dimerem obecnym w strukturach określonych w niniejszej pracy. Kolejną informacją, która z pewnością pojawi się podczas deponowania struktur w PDB, jest sekwencja nadprodukowanego konstruktów w porównaniu ze strukturą określoną na podstawie map gęstości elektronowej, które fragmenty są ucięte na skutek proteolizy, a które niewidoczne z powodu labilności konformacyjnej.

Drugim obiektem badań doktorantki było białko N, będące głównym elementem strukturalnym nukleokapsydu ludzkiego koronawirusa NL63. Wirus ten odpowiada za infekcję górnych i dolnych dróg oddechowych u ludzi. Białko N jest zaangażowane ponadto w inne procesy, w tym replikację wirusa oraz unikanie odpowiedzi układu immunologicznego. Rola białka N w replikacji wirusa jest względnie dobrze poznana, natomiast struktura białka N  $\alpha$ -koronawirusa NL63 nie była znana w chwili rozpoczęcia badań.

Białko N pełnej długości zawiera środkowy nieustrukturyzowany element łącznikowy pomiędzy domenami N- i C-terminalną. Ten konformacyjnie labilny fragment sprawia prawdopodobnie, że białko pełnej długości jest bardzo trudne (albo wręcz niemożliwe) do wykrystalizowania. Pierwszym wyzwaniem biochemicznym było określenie stabilnych fragmentów domen N- i C-terminalnych zdolnych do krystalizacji. Analiza porównawcza z innymi białkami nukleokapsydowymi pozwoliła na opracowanie konstruktów odpowiadających domenom N- i C-końcowym. Otrzymano czyste, stabilne preparaty białkowe, które poddano krystalizacji. O ile krystalizacja domeny N-końcowej nie nastręczyła trudności, to wykrystalizowanie domeny C-końcowej wymagało pracochłonnych prób ograniczonej proteolizy w kropli krystalizacyjnej z zastosowaniem kilku enzymów proteolitycznych. Najskuteczniejsza okazała się proteaza V8, której dodatek do kropli krystalizacyjnej pozwolił na uzyskanie kryształów o bardzo dobrych właściwościach dyfrakcyjnych.

Na podstawie danych dyfrakcyjnych zebranych na linii pomiarowej synchrotronu w Hamburgu wyznaczono struktury krystaliczne domen N- i C-końcowych (odpowiednio NTD, reszty 10-140 i CTD, reszty 221-340) białka N pochodzącego z  $\alpha$ -koronawirusa HCoV NL63, obydwie z rozdzielczością 1.5 Å. Obie struktury białkowe NTD i CTD zostały bardzo dobrze opisane strukturalnie i porównane z analogicznymi białkami innych wirusów. W oparciu

o strukturę NTD zaproponowano model wiązania RNA, a następnie zweryfikowano go eksperymentalnie. Struktura domeny CTD ukazała, że białko N w naturze występuje w formie dimeru. Badania te pozwoliły na lepszy wgląd w początkowe etapy interakcji białko N / kwas nukleinowy. Badania opublikowano w 2017 r. w czasopiśmie *Journal of Virology*, 91(11), e02503-16.

Podobnie jak dla białka P5, poprosiłbym doktorantkę o uzupełnienie kilku informacji na temat sekwencji pełnej długości białka N nukleokapsydu ludzkiego koronawirusa NL63, podobieństwa sekwencyjnego i długość elastycznego fragmentu łącznikowego pomiędzy domenami NTD i CTD w porównaniu z innymi wirusami. Interesowałaby mnie też dla domeny CTD sekwencja naprodukowanego konstruktów w porównaniu ze strukturą określoną na podstawie map gęstości elektronowej, które fragmenty są ucięte na skutek proteolizy *in situ*, a które są niewidoczne z powodu labilności konformacyjnej. Interesuje mnie również, czy pani Bożena Szelażek uczestniczyła w pomiarach dyfrakcyjnych, czy otrzymała kryształy i później obrabiała obrazy dyfrakcyjne, rozwiązywała i udokładniała struktury krystaliczne badanych białek.

Recenzja zawiera kilka pytań i sugestii dotyczących przedstawionego projektu badawczego, nie jest to wytknięcie błędów, a raczej dociekliwość recenzenta, który wolałby mieć odpowiedzi na pojawiające się pytania w treści rozprawy, niż doszukiwać się ich w odnośnikach literaturowych.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej poszerzają podstawową wiedzę na temat fizjologii wirusów, w szczególności roli transglikozylazy P5 z bakteriofaga  $\phi$  6 oraz białka nukleokapsydu HCoV NL63. W szerokiej perspektywie badania te mogą przyczynić się do opracowania metod kontroli patogenów roślinnych i przeziębieniowych zakażeń u ludzi.

W podsumowaniu stwierdzam, że pani Bożena Szelażek przedstawiła rozprawę doktorską posiadającą wysokie walory poznawcze. Doktorantka wykazała rozległą wiedzę z zakresu nadekspresji białek w systemach heterologicznych, zastosowania szerokiego spektrum metod pozwalających na charakteryzację biochemiczną badanych białek wirusowych, a przede wszystkim wiedzę z zakresu badań strukturalnych metodą dyfrakcji promieni Roentgena na kryształach białek. Doktorantka dysponuje solidnym i różnorodnym warsztatem eksperymentalnym i właściwie dobierała metody do rozwiązywania postawionych problemów badawczych. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią niewątpliwie nowość naukową.

Praca napisana jest bardzo dobrym językiem naukowym. Liczba 153 pozycji i różnorodność odnośników literaturowych koresponduje z wysokim poziomem prezentowanych badań. Czytając pracę widać, że autorka wnikliwie śledziła literaturę w całym okresie wykonywania badań.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Bożeny Szelażek 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), uwzględniając Rozporządzenie MNiSW z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2015 poz. 1842) oraz stosując kryteria zawarte w Rozporządzeniu MNiSW z dnia 1 września 2011 r. (Dz. U. nr 196, poz. 1165), dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie pani magister Bożeny Szelażek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Grzegorz Bryja*