

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bożeny Szelązek
pt. „Analiza struktury i funkcji białek wirusowych: transglikozylazy P5
z bakteriofaga ϕ 6 oraz białka nukleokapsydu ludzkiego koronawirusa NL63”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotorskim dr hab. Benedykta Władyki z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W rozprawie badane są struktury i właściwości dwóch białek wirusowych. Jednym z nich był enzymem lityczny bakteriofaga ϕ 6 infekującego bakterie *Pseudomonas*. Drugim obiektem badań było białko tworzące nukleokapsyd w niedawno zidentyfikowanym koronawirusie NL63, wywołującym zapalenie krtani i oskrzelików u ludzi.

Wirusy są fascynującym tematem badań, z różnych względów. Zajmują niezwykle miejsce w historii ewolucji życia, są wynikiem swoistej optymalizacji genetycznej i funkcjonalnej, a ostatnio zainteresowanie nimi rośnie ze względu na ich potencjalną rolę w zwalczaniu infekcji bakteryjnych w sytuacji, gdzie wyczerpują się możliwości terapii antybiotykowych wobec rosnącej oporności patogennych bakterii.

Cele badań zostały zdefiniowane na początku rozprawy. Doktorantka podjęła się wyjaśnienia, jaką dokładnie funkcję enzymatyczną posiada białko P5 z bakteriofaga ϕ 6. Dotychczasowe doniesienia literaturowe sugerowały, że jest to proteaza lub transglikozylaza. Struktura krystalograficzna P5 została opublikowana kilka lat wcześniej, jednak w tamtym badaniu nie analizowano aktywności tego białka. Drugim celem doktorantki było strukturalne i funkcjonalne scharakteryzowanie białka nukleokapsydu koronawirusa. Doktorantka wybrała, jako metody badawcze, krystalografię a także różne biochemiczne i biofizyczne metody służące enzymatycznej charakterystyce białek i stanu w roztworze. Posłużyła się też standardowymi narzędziami biologii molekularnej w celu uzyskania potrzebnych preparatów. Uważam, że problem jaki doktorantka podjęła się rozwiązać jest ambitny, interesujący z poznawczego punktu widzenia i dotyczy ważnego obszaru badań. Zatem teza naukowa postawiona przez nią jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

Układ i edycja rozprawy. Rozprawa liczy blisko 100 stron wraz z obszerną bibliografią i jest podzielona na rozdziały w sposób tradycyjny. Po streszczeniu i przedstawieniu celu pracy następuje wprowadzenie, metodyka badań, wyniki, dyskusja i wnioski. Rozprawa napisana jest poprawną polszczyzną w sposób przystępny, stylistycznie na dobrym poziomie. Tekst jest starannie ilustrowany. Podsumowując stwierdzam, że doktorantka wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

Część literaturowa. Wprowadzenie przedstawia w sposób treściwy historyczne tło i stan wiedzy w obszarze dotyczącym tematyki rozprawy. Najpierw pokrótce przedstawiona jest krystalografia od początków do stanu obecnego. Nieco szerzej potraktowana jest wirusologia. Po krótkim rysie historycznym badań nad wirusami opisane są bakteriofagi i ich enzymy,

a następnie koronawirusy. Bibliografia liczy ponad sto pięćdziesiąt pozycji literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktorantki w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Rozdział poświęcony metodyce badań podzielony jest na spis użytych materiałów i krótkie opisy zastosowanych metod. Wymienia sposoby klonowania genów, produkcji i oczyszczania białek oraz ich wariantów, a także sposoby przygotowania materiałów do testów enzymatycznych i analizy produktów reakcji, krystalizacji i rozwiązania struktur krystalicznych oraz ich modelowania. Opisuje też kilka innych metod biofizycznych użytych do charakteryzacji badanych białek. Stwierdzam, że opis metodologii jest zwięzły, ale wystarczający, aby wyniki eksperymentów doktorantki uznać za wiarygodne.

Przechodzę do omawiania *Wyników*. Doktorantka przygotowała białko P5 z bakteriofaga w formie dzikiej oraz serię mutantów, które posłużyły do zbadania tego białka pod kątem aktywności peptydazy i transglikozylazy, z użyciem naturalnych i syntetycznych substratów. W wyniku tych prac, prowadzonych we współpracy z zagranicznym laboratorium, wykazano, że P5 jest lityczną transglikozylazą, a nie peptydazą, chociaż peptydy prawdopodobnie są potrzebne do rozpoznawania substratu. Wyniki te wyjaśniają otwartą kwestię, wcześniej nie rozstrzygniętą. Następnie doktorantka wykrystalizowała P5 i poddała je analizie rentgenograficznej. Rozwiązała kilka struktur formy dzikiej i bez ligandu, a czego w bazie PDB umieściła jedną. Kontynuując prace krystalograficzne skupiła się następnie nad otrzymaniem kompleksu białka z ligandami. Rozwiązała „wiele struktur, z których większość nie zawierała ligandu”, ale ostatecznie udało jej się otrzymać kompleks zmutowanego białka o obniżonej aktywności (mutacja E95A) z ligandami w miejscu wiązania substratu, po tym, jak dodała do roztworu krystalizacyjnego substraty (NAG)₅ i (NAG)₆. Pozwoliło jej to scharakteryzować miejsce wiązania substratu. Wykazała kluczową rolę kwasu glutaminowego E95. Tylko część oligomeru NAG jest widoczna na mapach gęstości elektronowej, co prawdopodobnie świadczy o tym, że enzym nawet w formie zmutowanej, w której wymieniono w miejscu aktywnym resztę kwasu glutaminowego na alinę, zachował dostateczny poziom aktywności, aby zhydrolizować substrat. Nie dziwi mnie, że śladowa aktywność zostaje nawet po zamianie aktywnej reszty aminokwasowej na nieaktywną. Są inne na to przykłady. Możliwe, że lepsze szanse na uchwycenie kompleksu białka z substratem dałoby nasączenie kryształów substratem tuż przed pomiarami raczej niż zastosowana tu ko-krystalizacja. Małe ligandy dyfundują w kryształach białek w ciągu niewielu sekund. Niemniej doktorantka definiuje miejsca wiązania kilku reszt cukrowych. Analizuje też efekt znanego polimorfizmu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) i dochodzi do wniosku, że mutacja ta wprawdzie wpływa na strukturę miejsca wiązania substratu, ale skutkuje alternatywnym wiązaniem, gdzie utrata niektórych wiązań między substratem a białek jest kompensowana innymi oddziaływaniami. Na koniec analizy białka P5 doktorantka testuje rolę segmentów N- i C-końcowych w modulacji aktywności enzymatycznej i rzeczywiście skonstruowane przez nią mutanty w tych częściach białka mają bardzo mocno obniżoną aktywność.

Trochę mnie zastanawia to, że doktorantka, jak pisze, zidentyfikowała liczne warunki krystalizacji i rozwiązała szereg struktur, ale zdeponowała tylko niektóre. Zrozumiałem z tekstu, że białko natywne, bez ligandu, wykrystalizowało w kilku różnych formach, a czego analizowano i zdeponowano jedną. Wiem z doświadczenia, że wykrystalizowanie białka i rozwiązanie jego struktury to sporo pracy i chyba nieczęsto się zdarza, żeby krystalografowie nie robili jakiegoś użytku ze swoich danych, o ile te dane spełniają kryteria

jakości. Powinno się, moim zdaniem, deponować wszystkie poprawne struktury, które różnią się choćby grupą przestrzenną kryształu. Ile było takich struktur i dlaczego doktorantka rozwiązała ich tyle, żeby potem wybrać tylko jedną? Proszę o przybliżenie tego aspektu w czasie obrony. Zachęcam też do zdeponowania w PDB wszystkich form krystalicznych białka P5. Temu właśnie służy ta baza danych.

Inne uwagi odnośnie badań białka P5:

Na Rysunku 9 pokazane jest białko P5 z ligandem. Widoczna jest też Glu95. Jednak z tekstu zrozumiałem, że do tworzenia kompleksów z ligandami użyty był mutant w którym Glu zastąpiona była alaniną (E95A). Proszę o wyjaśnienie.

W Tabeli 13 rozdzielczość dla P5(wt) podana jest jako 1,95 Å, a w tekście znalazłem 1,66. Proszę o wyjaśnienie.

W tejże tabeli statystyki R-merge wyglądają niedobrze: 0.326. Również siła sygnału $I/\sigma(I)$ jest bardzo słaba: średnio 3,6. Jednak statystyki udokładniania modelu wyglądają równie dobrze jak dla dwóch innych struktur, które mają dużo lepsze statystyki danych. Jak to wytłumaczyć?

Z chromatografii SDS białka otrzymanego z rozpuszczonych kryształów wynika, że uległy one degradacji proteolitycznej przed krystalizacją. Prawdopodobnie odcięte zostały części N- i C-końcowe, które są niewidoczne w mapach gęstości elektronowej. W tekście jest napisane, że kryształy pojawiały się w ciągu 10 dni. Czy możliwe jest, że białko użyte do testów enzymatycznych też było zdegradowane w jakimś stopniu? Jest to ważne o tyle, że doktorantka badała wpływ końców N- i C- na aktywność enzymatyczną białka.

Pracując nad drugim z wybranych białek, doktorantka przygotowała szereg konstruktów kodujących warianty białka N z koronawirusa, poddała je ekspresji i oczyściła. Następnie wykryła domenę N-terminalną, a po zastosowaniu ograniczonej proteolizy także C-terminalną. W trakcie oczyszczania części N-końcowej zauważyła, że białko współmigruje na kolumnach chromatograficznych z obecnym w roztworze RNA. Zbadała więc powinowactwo domeny N-końcowej do RNA, używając do tego dwóch metod: polaryzacji fluorescencji i termoforezy. Opisała obie struktury krystalograficzne, a w przypadku części N-końcowej zauważyła wiązanie do białka kilku jonów siarczanowych, co zinterpretowała jako wskazówkę, w jaki sposób może się wiązać RNA, a konkretnie jego szkielet fosforanowo-cukrowy. To wskazuje z kolei na niespecyficzność takiego wiązania i jest zgodne z oczekiwaniami dla koronawirusa. W oparciu o te wskazówki zbudowano we współpracy z bioinformatykiem model takiego kompleksu białka z RNA. Opisana przed doktorantką struktura C-terminalnej domeny jest pierwszym przykładem tej domeny białka dla alfa-koronawirusów.

Tabela 16 pokazuje wyniki badań powinowactwa N-terminalnej domeny i jego mutantów do RNA. Wyznaczone stałe wiązania metodami polaryzacji fluorescencji i termoforezy znacznie się różnią. Jak wytłumaczyć te różnice?

Doktorantka rozwiązała osobno struktury domen N- i C-terminalnych, bo inaczej się nie dało. Chciałem jednak zapytać, co wiadomo skądinąd o relacji między tymi domenami w kapsydie wirusa

Część wyników badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy została opublikowana w *Journal of Virology*. Jest to cenione od lat czasopismo naukowe w dziedzinie wirusologii, posiadające stabilną pozycję i wysokie notowania (*Impact Factor* za 2017, 4,37). Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy. Ponadto doktorantka jest współautorem dwóch innych liczących się publikacji, dotyczących innych projektów. Nadmieniono też, że w przygotowaniu są kolejne prace, z których jedna dotyczy zawartej w rozprawie analizy białka P5.

Podsumowując, oceniam niniejszą rozprawę pozytywnie. Doktorantka dobrze sprostała wyzwaniom. Mgr Bożena Szelażek dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze krystalografii. Opanowała też narzędzia inżynierii genetycznej, preparatyki biochemicznej i niektóre techniki biofizyczne. Rozwiązała postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwej do danego zadania metody. Wykazała się starannością i wnikliwością w dążeniu do naukowego celu. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu.

Wojciech Rymuś

Poznań, 11 stycznia 2019 roku