dr hab., prof. UG
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 6.05.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Stach

pt.: „Charakterystyka biochemiczna i strukturalna wybranych proteinaz *Staphylococcus aureus*" wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

(promotor: dr hab. Grzegorz Dubin)

Bohaterką dysertacji doktorskiej mgr Natalii Stach jest bakteria *Staphylococcus aureus*. Bakteria ta zgodnie z hipotezą Czerwonej Królowej nie ustaje w ewolucyjnym wyścigu zbrojeń przeciw tworzonym przez ludzi antybiotykom. Nazwa hipotezy Czerwonej Królowej jest zapożyczeniem z powieści Lewisa Carrolla *„Po drugiej stronie lustra"* w której Czerwona Królowa szachów, biegnąc bez przerwy wraz ze zmieniającym się otoczeniem, mówiła do Alicji: *Tutaj (...), aby utrzymać się w tym samym miejscu, trzeba biec ile sił.* Dlatego naukowcy muszą „biec ile sił" i stale ulepszać właściwości antybiotyków oraz poznawać „działania zbrojne" tej groźnej bakterii po to „aby utrzymać się w tym samym miejscu". Jednym z „działań zbrojnych" bakterii *Staphylococcus aureus* jest wytwarzanie wielu czynników wirulencji, wśród których ważną rolę odgrywają proteazy sekrecyjne. Bakteria ta wydziela do dziewięciu proteaz serynowych, dwie proteazy cysteinowe oraz jedną metaloproteazę. Proteazy te wpływają na szereg procesów przebiegających podczas infekcji bakteryjnej. Zalicza się do niech między innymi inaktywację inhibitorów proteaz gospodarza, degradację immunoglobulin, modyfikację powierzchni bakterii, hydrolizę naturalnych peptydów antybakteryjnych itp. itd. Wydaje się więc, że dobrą strategią walki z bakterią *Staphylococcus aureus* jest unieczynnienie proteaz sekrecyjnych. Aby do tego doprowadzić ważne jest poznanie struktury przestrzennej, a szczególnie budowy kieszeni katalitycznej tychże enzymów, ustalenie optymalnych sekwencji aminokwasowych substratów tych proteaz, a także opracowanie inhibitorów i sond molekularnych wydaje się atrakcyjnym i aktualnym celem badawczym. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie dla opracowania kandydatów na lek przeciwbakteryjny lub posłużyć celom diagnostycznym. Nie bez znaczenia jest również możliwość projektowania nowych enzymów o specyficznej aktywności biologicznej, co może mieć w przyszłości zastosowanie w biotechnologii. W nurt tych badań wpisuje się praca doktorska mgr Natalii Stach. Problem badawczy postawiony w dysertacji Doktorantki znajduje się obecnie w polu dużego zainteresowania mikrobiologów, lekarzy i epidemiologów, gdyż z powodu lekoopornych bakterii *Staphylococcus aureus* umiera co roku na całym świecie wiele tysięcy osób. Nie dziwi więc zainteresowanie Doktorantki tą niezwykle ciekawą tematyką badawczą.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką dr hab. Grzegorza Dubina, który posiada znakomite doświadczenie w badaniu proteaz oraz ustalaniu ich struktur krystalograficznych. Badania nad ustalaniem preferencji substratowej metodami chemii kombinatorycznej z wykorzystaniem substratów fluorescencyjnych zostały wykonane we współpracy z prof. dr hab. Adamem Lesnerem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz we współpracy z prof. dr hab. Marcinem Drągiem z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Badania

nad wyznaczaniem miejsca cięcia z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas zostały wykonane we współpracy z dr Sylwią Kędracką-Krok z Małopolskiego Centrum Biotechnologii.

Rozprawa obejmuje 122. strony maszynopisu, jest napisana poprawną polszczyzną i podzielona jest na 8 głównych rozdziałów (tj. streszczenie, wstęp czyli część literaturowa, cel pracy, wyniki, materiały i metody, dyskusja, podsumowanie i bibliografia). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów. Na końcu znajduje się spis piśmiennictwa, który obejmuje 134. pozycje literaturowe (14 stron). W pracy umieszczono kilka tabel, rysunków i schematów, które ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu nauk przyrodniczych. W pracy znalazłam kilka błędów edycyjnych i stylistycznych, głównie w części dotyczącej badań własnych, ale w żaden sposób nie umniejszają one wysokiej wartości pracy. Mam jednak drobne uwagi ogólne dotyczące struktury lub nazwy podrozdziałów w rozprawie doktorskiej:

1. Dlaczego w rozdziale zatytułowanym „Wprowadzenie" przedstawiony został dorobek naukowy Doktorantki? Tytuł „Wprowadzenie" sugeruje, że czytelnik zostanie wprowadzony w tematykę pracy a nie w tematykę dorobku naukowego Doktorantki.
2. Dlaczego Rozdział 3.2 został zatytułowany „Proteaza SplE", choć tak naprawdę dotyczy dwóch proteaz tj. SplB oraz SplE, dla których Doktorantka wyznaczała determinanty specyficzności.
3. Rozdział zawierający bibliografię został zatytułowany „Referencje" a nie „Bibliografia" lub „Spis literatury". W języku polskim referencje oznaczają opinię pracodawcy o pracowniku a nie spis literatury.

Doktorantka, w krótkim „Wstępie", wprowadziła czytelnika w tematykę proteaz, ich klasyfikacji, mechanizmu działania, specyficzności substratowej i metod jej oznaczania oraz roli proteaz w wirulencji bakterii w tym bakterii *Staphylococcus aureus*. Ta część rozprawy doktorskiej („Wstęp") w sposób bardzo przejrzysty wprowadza czytelnika w problematykę dysertacji. Bardzo wysoko oceniam opis bakteryjnych proteaz serynowych Spl, gdyż pokazuje on dotychczasowy stan wiedzy na ich temat. To z tego rozdziału czytelnik dowiaduje się, że brak jest dokładnej charakterystyki białek SplB, SplE i SplF, które stały się obiektem badań mgr Natalii Stach. W tej części pracy przegląd literaturowy został dokonany starannie, a cytowane prace pochodzą z ostatnich pięciu lat.

W kolejnej części pracy („Cel pracy") mgr Natalia Stach przedstawiła dwa główne cele swojej pracy do których należała **charakterystyka specyficzności substratowej oraz ustalenie struktury krystalograficznej proteazy SplF** oraz **ustalenie determinant specyficzności substratowej proteaz SplB oraz SplE**.

Kolejny rozdział pracy, zatytułowany „Wyniki", został przez Doktorantkę podzielony na dwie zasadnicze części tj.: podrozdział „Proteaza SplF" oraz podrozdział „Proteaza SplE". Podział ten jest zgodny z obiektami badawczymi. W podrozdziale dotyczącym proteazy SplE Doktorantka opisała wyniki dotyczące ekspresji, oczyszczania i wstępnej aktywności proteolitycznej trzech mutein białka SplF, różniących się przyłączonym dodatkowym fragmentem na N- lub C-końcu białka. Następnie bardzo szczegółowo opisała badania nad specyficznością substratową tej proteazy wykorzystując do tego celu syntetyczne biblioteki kombinatoryczne oraz substraty białkowe. Ustaliła, że posiada ona rozbudowane miejsce wiązania substratu i rozpoznaje kolejno reszty aminokwasowe o sekwencji Tyr-Met-Leu poprzedzające hydrolizowane wiązanie. W tej części pracy określiła również parametry kinetyczne dla wariantów białka SplF o różnej długości N-końca i pokazała, że wydłużenie N-końca białka zmniejsza jego aktywność enzymatyczną. W dalszej części tego podrozdziału mgr Stach ustaliła strukturę przestrzenną muteiny His39Ala białka SplF. Uważam, że w aspekcie tych badań Doktorantka słabo podkreśliła swój wkład w żmudną pracę związaną z optymalizacją warunków krystalizacji. Udowodniła podobieństwo strukturalne

białka SplF do białka SplB oraz pokazała różnice w zakresie ułożenia N-końca w obu tych białkach. W mojej ocenie ta część pracy powinna być wzbogacona kilkoma dodatkowymi rysunkami, które pokazałyby opisywane w pracy szczegóły strukturalne białka SplF. W drugim podrozdziale Doktorantka badała determinanty specyficzności substratowej proteaz SplB oraz SplE. W tym celu zaprojektowała i uzyskała sześć mutein białek (po trzy dla każdego z nich). Dzięki ukierunkowanej mutagenezie przekierowała specyficzność substratową proteazy SplB w kierunku SplE, czego nie udało się jej osiągnąć w przeciwnym kierunku (tj. z SplE do SplB). Dzięki tym badaniom udowodniła, że w determinację specyficzności substratowej enzymu jest zaangażowana zarówno klasyczna komponenta statyczna (kieszenie wiążące substrat, triada katalityczna) jak i znacznie trudniej uchwytny element dynamicznej kooperacji między zdefiniowanymi klasycznym opisem determinantami specyficzności. Podsumowując, przedstawione powyżej najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe, gdyż dotyczą słabo poznanych proteaz serynowych bakterii *Staphylococcus aureus,* a które mają istotne znaczenie w procesach wirulencji. Dzięki pracy, którą wykonała pani Natalia Stach można śmiało powiedzieć, że hipoteza Czerwonej Królowej pasuje nie tylko do bohaterki tej dysertacji ale również do samej Doktorantki, która przy wsparciu Promotora uczestniczyła w „wyścigu zbrojeń" przeciwko bakterii *Staphylococcus aureus*, „biegnąć ile sił„ w poznawaniu jej (bakterii) „uzbrojenia".

Po lekturze rozdziału, zatytułowanego „Wyniki", nasuwają się następujące pytania lub sugestie.

1. Jakie jest uzasadnienie dla zastosowania badania specyficzności substratowej białka SplF posiadającego na N- lub C-końcu sześć histydyn? Nie znalazłam takiego wyjaśnienia w pracy.
2. Co oznacza na Rysunku 8 pik zaznaczony zielonym prostokątem? Brak jest tego wyjaśnienia. Pod rysunkiem (str. 50) powinien być zapis „metodą negatywnej chromatografii jonowymiennej".
3. W podpisie Rysunku 9 istnieje informacja, że w przypadku białek z metką histydynową dochodzi do procesu autohydrolizy białka w wyniku której pojawia się dodatkowy prążek na żelu. Proszę o pokazanie tego prążka. Czy oszacowane zostało stężenie białka pozbawionego metki 6xHis?
4. Doktorantka wyznaczała parametry kinetyczne dla białka His_6-SplF które, jak opisała wcześniej ulegało autohydrolizie. Czy przed badaniami kinetycznymi wyznaczane było rzeczywiste stężenie enzymu z fragmentem 6xHis na N-końcu? Być może w roztworze znajdowała się mieszanina dwu białek? Jak było wyznaczane stężenie białka His_6-SplF? Aby prawidłowo wyznaczyć k_{cat} należy wyznaczyć $[E_0]$, czyli stężenie badanego enzymu, gdyż roztwór mógł zawierać frakcję enzymu pozbawionego metki histydynowej.
5. Dlaczego podczas projektowania bibliotek kombinatorycznych użyta została norleucyna? Norleucyna jest izosterem metioniny, co prawdopodobnie dało podobne wyniki dla Met i Nle podczas trawienia enzymem SplF (Rysunek 10).
6. Zapis sekwencji aminokwasowej bibliotek peptydowych jest niejednorodny w całej pracy. Doktorantka czasami stosowała kody trójliterowe aminokwasów a czasami jednoliterowe, czasami były one przedzielone kreską a czasami pisane jednym ciągiem. Zapis taki może to być mylący, szczególnie w świetle zapisu Ac-WELX-ACC, gdzie ACC może oznaczać zarówno fluorofor jak i alanylo-cysteinylo-cysteinę. Podobnie niejednorodny jest zapis nazw fluoroforów Abz i Anb - dużymi lub małymi literami, choć w tym przypadku można mówić jedynie o błędzie edytorskim.
7. W pracy w której opisywana jest aktywność białek oraz dyskutowane są podobieństwa strukturalne pomiędzy białkami warto było by umieścić sekwencje aminokwasowe tych białek i pokazać ich wspólne elementy struktury pierwszorzędowej.

8. Co oznaczają niebieskie przerywane linie na Rysunku 14 (str. 62)? Na tym samym rysunku widać cztery zaznaczone reszty seryny a nie dwie. Dlaczego?
9. Dlaczego w pracy pokazane i opisane zostały wyniki z ekspresji i oczyszczania jedynie dla proteazy SplF, podczas gdy dla pozostałych białek wyniki te zostały pominięte?
10. Dlaczego na rysunkach z pokazana specyficznością substratową proteaz SplB, SplE oraz ich mutein pokazane są słupki błędów, podczas gdy dla proteazy SplF nie są zaznaczone?
11. Dlaczego do dokowania substratu do hybrydowego modelu białka SplF użyty został tripeptyd o sekwencji Tyr-Gln-Met a nie o sekwencji Tyr-Met-Leu, wyznaczonej w pierwszym etapie prac Doktroantki?
12. Czy w cysteinie występuje reszta czy grupa sulfhydrylowa?

Chciałabym zaznaczyć, że podczas realizacji doktoratu mgr Stach umiejętnie posługiwała się licznymi technikami inżynierii genetycznej, chemii białka, biotechnologicznymi, enzymatycznymi a hydrolizę peptydów monitorowała spektrometrią mas. Wszystkie eksperymenty opisała w rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody". Lista zastosowanych metod eksperymentalnych jest długa i zróżnicowana co bardzo dobrze świadczy o opanowaniu warsztatu laboratoryjnego, tak ważnego a tym etapie rozwoju kariery naukowej. Pani mgr Stach zastosowała właściwe metody i procedury wymagane od biotechnologa, biochemika i krystalografa. Moje zainteresowanie podczas lektury tej części pracy wzbudził rozdział dotyczący badania stopnia oligomeryzacji białek. Nie znalazłam informacji o stopniu oligomeryzacji białek w części wynikowej pracy. Dużym zaskoczeniem podczas lektury tej części pracy był rozdział dotyczący budowania modeli hybrydowych białek SplF oraz SplE oraz dokowania do nich tripeptydów. Wyniki dotyczące dokowania znajdują się w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja". W mojej opinii ta część badań powinna znaleźć swoje miejsce w rozdziale opisującym wyniki pracy. Prawidłowe umieszczenie opisu uzyskanych rezultatów w dziale wyników a potem ich dyskusja to umiejętność niełatwa ale bardzo ważna.

W ostatnim rozdziale zatytułowanym „Dyskusja" Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski swojej pracy doktorskiej. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam **ustalenie specyficzności substratowej dotychczas nieznanej proteazy SplF, określenie roli N-końca białka w jego aktywności enzymatycznej oraz ustalenie determinant specyficzności substratowej białka SplE**. Na szczególną uwagę zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę bardzo szczegółowej i dojrzałej dyskusji uzyskanych wyników w kontekście innych białek z rodziny Spl oraz w świetle danych literaturowych.

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zostały zinterpretowane poprawnie. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr Natalii Stach zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Kandydatka wykazała się ponadto znajomością w zakresie różnych technik fizykochemicznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań opublikowane zostały w czasopiśmie *„Structure"* (2018), gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem. Jest tez współautorką 4 artykułów oryginalnych w czasopismach z listy JCR oraz jednego artykułu przeglądowego. Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Natalii Stach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sylwia Rodziewicz-Motowidło