Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII BIAŁEK
ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 28 89

www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 14 stycznia 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Michała Zdżalika

"Unikalny mechanizm aktywacji proteinazy SplB gronkowca złocistego"

Proteazy serynowe są największą i najlepiej opisaną grupą enzymów. Białka te biorą udział w bardzo wielu procesach życiowych organizmów. Ze względu na rolę którą pełnią oraz możliwe destrukcyjne efekty działania, ich aktywność biologiczna musi być precyzyjnie kontrolowana. Ponad 60 lat badań nad tą grupą enzymów dostarczyło olbrzymiej wiedzy na temat mechanizmu katalizy, aktywacji, kontroli aktywności oraz struktur przestrzennych. Mimo to, cały czas odkrywane są nowe, zaskakujące cechy tych enzymów. Rozwiązanie około 10 lat temu struktury proteinazy SplB z gronkowca złocistego przyniosło ciekawe odkrycie, niezbędny dla procesu katalizy element - miejsce wiązania oksyanionu, występuje w konformacji nieaktywnej. Mimo to enzym wykazuje aktywność hydrolityczną.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania miały na celu szczegółowe poznanie podstaw strukturalnych mechanizmu regulacji proteolizy katalizowanej przez SplB. Praca doktorska została zrealizowana pod opieką merytoryczną dr. hab. Grzegorza Dubina, który posiada znaczący dorobek w badaniach strukturalnych białek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 80 stron i została podzielona w tradycyjny sposób. Rozdział Wstęp liczy 18 stron, Materiały i Metody zajmują 4 strony, Wyniki oraz Dyskusja odpowiednio 30 i 11 stron. Bibliografia zawiera 81 pozycji literaturowych.

Autor rozprawy rozpoczyna Wstęp informacjami o chorobach wywoływanych przez bardzo groźny organizm patogenny - gronkowca złocistego. Dalej doktorant przechodzi do omówienia wybranych enzymów wydzielanych przez ten mikroorganizm, opisuje mechanizmy aktywacji oraz główne aktywności biologiczne tych białek. Następnie przechodzi do opisu niedawno odkrytych proteinaz Spl, które są przedmiotem badań zebranych w rozprawie. Możliwe, że białka te biorą udział w patogenezie gronkowca złocistego.

Mgr Zdżalik w kolejnych częściach Wstępu opisuje biochemiczne oraz strukturalne badania proteinaz Spl. Rozpoczyna opis od charakterystyki strukturalnej białka SplC oraz możliwych przyczyn niemożności otrzymania rekombinowanego aktywnego enzymu. Następnie omawiana jest proteinaza SplB, dla której udało się wyznaczyć specyficzność substratową. Przy okazji autor sugeruje nietypową rolę peptydu sygnalnego proteinazy SplB. Rozwikłanie jego funkcji na podstawie danych strukturalnych jest jednym z celów rozprawy doktorskiej. W dalszej części, doktorant opisuje

proteinazy SplA oraz SplD. Podobnie jak dla poprzednich, omawia charakterystykę biochemiczną oraz strukturalną białek.

Kolejna część wstępu poświęcona jest strukturom zymogenów. Autor rozprawy przedstawia klasyczny mechanizm aktywacji chymotrypsynogenu, a na tym tle proteinaz podrodziny S1B. Dalej opisuje klasyczny mechanizm katalizy proteinaz serynowych, a następnie wprowadza w zagadnienia związane z budową centrum katalitycznego enzymu SplB, szczegółowo omawiając miejsce wiązania oksyanionu. Doktorant opisuje również, indukowane substratem, tworzenie miejsca wiązania oksyanionu w przypadku czynnika krzepnięcia krwi VIIa, sugerując, że podobny mechanizm może zachodzić w proteinazie SplB. Wstęp kończy informacjami o inhibitorach fosfonianowych, mechanizmie ich działania oraz zastosowaniu w badaniach strukturalnych.

W przedstawionej do recenzji pracy mgr Zdżalik stawia hipotezę o indukowanym wiązaniem substratem mechanizmie aktywacji enzymu SplB. W ramach prowadzonych badań otrzymuje struktury białka w stanie wolnym oraz w kompleksie z inhibitorem fosfonianowym, naśladującym tetraedryczny stan przejściowy substratu. Przeprowadzona analiza strukturalna kompleksów SplB z inhibitorem dostarcza dowodów potwierdzających indukowany obecnością substratu (inhibitora) mechanizm aktywacji proteinazy, co zaprezentowano i omówiono w dalszej części rozprawy.

Do najważniejszych wyników mgr. Michała Zdżalika zaliczam:

i. Uzyskanie rekombinowanych białek GS-SplB, SplB. Preparaty otrzymano w bakteryjnych systemach ekspresyjnych, a następnie oczyszczone metodami chromatograficznymi.
ii. Otrzymanie nadających się do pomiarów dyfrakcyjnych kryształów, zebranie danych oraz rozwiązanie struktur przestrzennych enzymów GS-SplB, apo-SplB oraz SplB w kompleksie z inhibitorem aminofosfonianowym. Białka były krystalizowane metodą kropli siedzącej, dane zostały zebrane na synchrotronach DESY (Niemcy) i SLS (Szwajcaria), struktury przestrzenne rozwiązane metodą podstawienia molekularnego. Struktury zostały otrzymane z dobrą jakością, co umożliwiło przeprowadzenie dalszych analiz.
iii. Wykazanie, że koniec N białka GS-SplB jest ruchliwy w roztworze. Uniemożliwia to formowanie natywnych wiązań wodorowych przez resztę Glu1, a w konsekwencji znacząco obniża aktywność enzymatyczną. Co ciekawe, pomiędzy białkami SplB i GS-SplB nie obserwuje się dużych zmian strukturalnych w obrębie centrum aktywnego, tak jak ma to miejsce w przypadku np. chymotrypsynogenu i chymotrypsyny.
iv. Potwierdzenie niekanonicznej orientacji miejsca wiązania oksyanionu w strukturze proteinazy SplB.
v. Określenie, że wiązanie inhibitora do SplB indukuje zmiany strukturalne prowadzące do odwróceniem wiązania peptydowego Ser154-Gly155, a przez to powstaje miejsce wiązania oksyanionu (pomimo, że reszta P1 inhibitora nie wchodzi do kieszeni S1). Orientacja reszt aminokwasowych jest zgodna z kanoniczą, obserwowaną np. w chymotrypsynie.
vi. Zaobserwowanie bardzo ciekawych zmian obsadzenia inhibitorem enzymów w strukturze kompleksu w grupie przestrzennej P212121. Spośród siedmiu cząsteczek białka w jednostce asymetrycznej tylko jedna nie była obsadzona inhibitorem.
vii. Wykazanie zmian strukturalnych w sposobie ułożenia inhibitora oraz histydyny z triady katalitycznej w zależności od grupy przestrzennej kompleksu. Pomimo to, inhibitor zawsze indukował powstanie miejsca wiązania oksyanionu.

viii. Zaproponowanie mechanizmu zależnej od obecności substratu aktywacji SplB. Dysponując kilkunastoma modelami białka w formie apo oraz związanej z inhibitorem (odzwierciedlającymi stan aktywny) autor rozprawy proponuje, w jaki sposób indukowana substratem rearanżacja centrum aktywnego i reszt je otaczających prowadzi do przyjęcia konformacji kanoniczej i przeprowadzenia reakcję hydrolizy.

Mam następujące uwagi oraz pytania:

Czy w przypadku mikroorganizmów możemy mówić o „zewnątrzwydzielniczych proteinazach"?.

Do fragmentu tekstu opisującego wydzielnicze proteinazy gronkowców (strona 8) nie podano cytowań.

Niefortunne jest określenie na stronie 15 „próba skorelowania ... zakończyła się niepowodzeniem, w tym sensie, że nie wykazano wyraźnej korelacji...."

Szkoda, że we wstępie jest tak mało rycin. Opisane przez Autora informacje strukturalnie znacząco zyskałyby na czytelności.

Autor odnosi się do opisu centrum aktywnego oraz miejsc oddziaływania substratu (S1, P1...) nie podając cytowania do pracy Schechtera i Bergera. We wstępie brakuje cytowania do pracy opisującej substratowe biblioteki peptydowe.

Niefortunne jest określenie „nie spowodowało ekspresji aktywności proteolitycznej", strona 20.

W materiałach znajduje się informacja o nadprodukcji SplB z użyciem wektora pWB980. Proszę o krótki opis procedury.

Dlaczego przygotowując kompleks SplB z inhibitorem miareczkowano enzym, monitorując jego aktywność, a nie dodano nadmiaru inhibitora?

Autor pracy używa oryginalnego rozwinięcia skrótu RMSD, „standardowe odchylenie współrzędnych kartezjańskich".

Szkoda, że cytowania zawierające więcej niż pięciu autorów zostały skrócone.

Czy znane są inne przypadki, żeby w jednostce asymetrycznej, nie wszystkie cząsteczki kompleksu były związane z inhibitorami?

Dlaczego możliwe było zaobserwowanie różnych sposobów wiązania inhibitora do enzymu w zależności od grupy przestrzennej w której krystalizowało białko?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa jest przykładem udanego połączenia badań strukturalnych oraz biochemicznych. Autor pracy z powodzeniem otrzymał kilka struktur białkowych w różnych grupach przestrzennych, co pozwoliło na wysuniecie wniosków na temat mechanizmu kontroli aktywności proteinazy SplB. Badania wykonane przez mgr. Michała Zdżalika pokazują,

że pomimo dostępności metod obliczeniowych oraz całego panelu technik biologii molekularnej, analizy strukturalne oparte na dyfrakcji promieniowania X są niezastąpione, jeśli chcemy poznać mechanizmy rządzące chemią białek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest bardzo wnikliwa, pracę cechuje dojrzałość naukowa i głęboka analiza wyników. Mając na uwadze opublikowanie rezultatów badań w renomowanych czasopismach, współautorstwo 11 publikacji naukowych oraz 14 struktur zdeponowanych w bazie PDB wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Unikalny mechanizm aktywacji proteinazy SplB gronkowca złocistego" jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym* z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr. Michała Zdżalika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Daniel Krowarsch