



ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 90
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290
fax. +48 71 325 21 51

Wrocław, 2022-07-07

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Morzywołek
pt.: „Charakterystyka enzymów litycznych z bakterii z rodzaju *Clostridium*
wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających
peptydoglikan”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Morzywołek, została wykonana w Katedrze Mikrobiologii na Wydziale Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Kaczorowskiego. Praca z zakresu biologii molekularnej, biologii strukturalnej oraz mikrobiologii poświęcona była nowatorskim badaniom nad budową, specyficznością enzymatyczną oraz zakresem działania enzymów rozkładających peptydoglikan kodowanych na genach pochodzenia fagowego i bakteryjnego.

Badania wykonane w pracy doktorskiej sfinansowano w ramach grantu Virus-X: Viral Metagenomics for Innovation Value (finansowanego ze środków Unii Europejskiej Horyzont 2020, Badania i Innowacje, nr grantu 685778) oraz dwóch Konkursów Młodych Naukowców (finansowanych przez Uniwersytet Gdański, nr grantów: 538-L135-B935-15; 538-L135-B251-16).

Tematyka rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualne trendy naukowe, ponieważ obecnie prowadzi się intensywne badania dotyczące poszukiwania alternatywnych środków terapeutycznych do zwalczania infekcji wywołanych przez wielooporne patogeny. Alternatywne metody leczenia obejmują między innymi immunoterapię, fagoterapię, oraz wykorzystywanie peptydów antybakteryjnych czy enzymów. Najwięcej uwagi poświęca się enzymom muralitycznym pochodzenia fagowego (endolizyny), bakteryjnego (autolizyny), czy produkowanym przez wrodzony układ immunologiczny organizmów wyższych, zdolnym do degradacji peptydoglikanu bakteryjnego. Badania nad lizynami są niezmiernie istotne również z punktu widzenia badań podstawowych, czyli zrozumienia ich struktury, funkcji, pochodzenia, czy ewolucji, jak i od strony potencjału aplikacyjnego, czyli możliwości stosowania w procesach



ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 90
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

przemysłowej produkcji żywności, rolnictwie, biologii molekularnej, biotechnologii, oraz w lecznictwie.

Pani mgr Agnieszka Morzywołek w swoich badaniach skupiła się na trzech enzymach kodowanych w genomach kilku gatunków bakterii z rodzaju *Clostridium*. Były to amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe należące do rodziny AMI-2. Białka te wykazywały również podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan i posiadających motyw wiążący jony Zn^{2+} . **Celem pracy** było zbadanie czy podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej pomiędzy wybranymi białkami *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens*, a eukariotycznymi białkami rozpoznającymi peptydoglikan znajduje istotne odzwierciedlenie w strukturze i właściwościach biologicznych białek klostridialnych.

Powyższe enzymy zostały przygotowane w formie białek rekombinowanych i przebadane pod względem indentyfikacji potencjalnego centrum katalitycznego, aktywności przeciwbakteryjnej i zakresu specyficzności wobec peptydoglikanu pochodzącego z różnych bakterii Gram-dodatnich. Wykonano również pełne analizy bioinformatyczne, oraz modele molekularne *in silico*. Projekt objął też analizę funkcjonalną białka HolB jako przypuszczalnej holiny kodowanej w kasecie litycznej wraz z endolizyną LysB.

Omówienie elementów rozprawy doktorskiej

Wstęp pracy zwarty na 30 stronach, został przygotowany w logicznym porządku z omówieniem wszystkich kluczowych elementów aktualnej wiedzy na temat charakterystyki i znaczenia klinicznego bakterii z rodzaju *Clostridium*, oraz bakteriofagów jako potencjalnego źródła endolizyn. Szczegółowo przedstawiono też mechanizmy działania systemów endolizyna-holina. Nawiązując do głównego celu pracy omówiono jednocześnie autolizyny bakteryjne oraz eukariotyczne białka rozpoznające peptydoglikan (PGRPs).

Moje pierwsze pytanie:

1. Proszę sprecyzować jaka jest biologiczna funkcja domeny CBD, która nadaje specyficzność, rozpoznaje substrat i wiąże się do ściany komórkowej bakterii? Czy bez tej domeny endolizyna nie będzie w stanie degradować peptydoglikanu? Jeśli tak, to po co istnieje domena CBD?

Rozdział materiały oraz osobno metody zawarte w sumie na 42 stronach rozprawy obejmowały opis głównych metod stosowanych w analizach *in silico*, produkcji i oczyszczaniu białek rekombinowanych, modyfikacji potencjalnego centrum katalitycznego enzymu



(mutageneza miejscowo-specyficzna), oraz metod stosowanych do oznaczania stabilności i aktywności przygotowanych enzymów. Bardzo ciekawe podejście zaproponowano do oceny funkcji potencjalnej holiny HoIB, która jest białkiem toksycznym dla komórek bakteryjnych. Wykorzystano tu test komplementacji faga λ Cl875tsSam7 z uszkodzoną kasetą lityczną.

Rozdział **wyniki** (zamieszczony na 40 stronach w piętnastu głównych podrozdziałach), oraz **dyskusję** (7 stron) omówię razem, ponieważ już w rozdziale wyniki zamieszczono częściowo wnioski płynące z przeprowadzonych doświadczeń.

Pierwszym elementem doświadczeń była dogłębna analiza *in silico*, w trakcie czytania której pojawiły się następujące pytania:

2. Sekwencja aminokwasowa HoIB wykazuje tylko 24,60% identyczności z białkiem TcdE pełniącym funkcję holiny biorącej udział w uwalnianiu toksyn *C. difficile* TcdA i TcdB i ok. 30% z innymi holinami pochodzenia fagowego. Czy możemy wnioskować, że toksyny oraz system ich uwalniania do środowiska jest pochodzenia fagowego i został adoptowany przez lizogenne clostridia?
3. Analiza *in silico* białka LysP sugeruje występowanie hydrofobowej domeny transbłonowej. Czy możemy porównać ten typ budowy do endolizyn fagowych SAR? Jeśli LysP jest białkiem toksycznym dla bakterii (przedwczesna liza), to w jaki sposób jest wykorzystywane przez bakterie *Clostridium*?

Po pierwszej fazie analiz *in silico*, przystąpiono do optymalizacji procesu produkcji i oczyszczania enzymów litycznych. Bardzo podobało mi się podejście eksperymentalne, w którym optymalizowano sekwencję nukleotydową tworząc syntetyczne geny w celu zwiększenia efektywności ekspresji białek rekombinowanych w systemie *E. coli*.

Pierwsze badane białko to endolizyna LysB (224 aa) kodowana na genomie profaga *C. botulinum* E3 Alaska E43, w obrębie kasety litycznej *lysB-hoIB*. Ekspresję LysB optymalizowano przez koprodukcję z białkiem opiekuńczym Tig.

4. A jak wyglądała optymalizacja produkcji dla pozostałych białek? Czy też wymagały białek opiekuńczych?

Dwa inne białka lityczne scharakteryzowane w niniejszej pracy, LysP (222 aa; 25690 Da) i LysPS (157 aa; 17840 Da) pochodziły odpowiednio z *C. perfringens* NCTC 8239 i *C. perfringens* ATCC 13124. Białka te różniły się jedynie 65 aminokwasową sekwencją na N-



końcu, która jest obecna w białku LysP, ale nie ma jej w białku LysPS. Dokonany prób ekspresji dla genów z dodatkiem metki histydynowej na N-końcu i C-końcu.

5. Jak wyjaśnić różnice w aktywność enzymów LysP oraz LysPS ze znacznikiem histydynowym zlokalizowanym odpowiednio na N- versus na C-końcu?

Rekombinowane enzymy scharakteryzowano pod kątem stabilności termicznej i aktywności w pH 3-11 oraz w stężeniu chlorku sodu w zakresie 0-300 mM. Optimum aktywności LysB przypadało na zakres pH 5-6, natomiast w pH 7 aktywność spadała do ok. 20%. Jednocześnie przy zastosowaniu techniki sączenia molekularnego i ultrawirowania analitycznego wykazano tendencje LysB do tworzenia dimerów.

I tu pojawiają się kolejne pytania:

6. W jakich warunkach pH było prowadzone badanie oligomeryzacji? Jeśli w pH 7, to może dimeryzacja skutkowałą niską aktywnością enzymatyczną białka, natomiast w optimum (pH 5-6) białko aktywne jest w formie monomeru?
7. Czy porównując wyniki wpływu warunków reakcji na aktywność klostridialnych białek litycznych o różnym pochodzeniu możemy podyskutować o zależnościach ewolucyjnych, w tym przydatności endolizyny dla gospodarza *Clostridium* i jego pasożyta (faga)?
8. Dlaczego w badaniu jednorodności białka testowano jedynie LysB?

Dane bioinformatyczne wsparte analizą modelu molekularnego LysB oraz badaniami opartymi o mutagenezę miejscowo-specyficzną wskazały, że pięć reszt aminokwasowych, H25, Y54, H126, S132 i C134, tworzy centrum katalityczne enzymu. Analiza modelu molekularnego białka LysB sugeruje, że dwanaście innych reszt, M13, H43, N47, G48 W49, A50, L73, A75, H76, Q78, N81 i Y182, jest zaangażowanych w wiązanie cząsteczki kwasu lipotejchojowego, istotnego składnika ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Białko LysB wykazuje aktywność lityczną wobec bakterii należących do rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Deinococcus*, a nie wobec bakterii Gram-ujemnych.

Mutagenesa miejscowo-specyficzna enzymów LysP i LysPS wykazała, że motyw wiążący jony Zn^{2+} jest krytyczny dla aktywności litycznej każdego z tych białek (LysP: H95, H193, C201; LysPS: H128, C136). Aktywność lityczną enzymów LysP i LysPS potwierdzono wobec bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, ale nie stwierdzono jej wobec bakterii Gram-ujemnych.



ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 90
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Ponadto wykazano, że spektrum lityczne LysPS jest szersze niż białka LysP, ponieważ wykazuje ono aktywność także względem *S. aureus* i *D. radiodurans*.

9. Czy badane lizyny mają budowę modułarną i posiadają domeny CBD?
10. Przy definiowaniu kluczowych reszt odpowiedzialnych za aktywność enzymatyczną jaki procent spadku aktywności możemy uznać za wskazujący na uszkodzenie centrum aktywnego? Czy spadek do 70-80% jest faktycznie znaczący, czy może jednak minimum to dwukrotny (50%)?

Co do formalnej strony dysertacji, Pani mgr Agnieszka Morzywołek zastosowała układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla monograficznych prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 129 stron, spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, bibliografię zawierającą 232 pozycje bibliograficznych głównie anglojęzycznych, oraz suplement. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatnie do prezentowanych treści. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym. Mam natomiast uwagi co do formy przedstawienia wyników, gdzie zabrakło informacji dlaczego część doświadczeń, takich jak optymalizacja produkcji przy użyciu białek opiekuńczych, badanie jednorodności białka, czy analiza oligomeryzacji, została ograniczona jedynie do endolizyny LysB.

Biorąc pod uwagę aspekty naukowe, muszę przyznać, że cały projekt był dla mnie niezwykle ciekawy, czytałam go z przyjemnością i stąd tak wiele pytań z mojej strony, na które wydaje się można odpowiedzieć spoglądając na uzyskane wyniki z większego dystansu.

Sugerowałabym też przedstawienie w paru punktach głównych wniosków płynących z przeprowadzonych badań. Można ten element włączyć do prezentacji przygotowywanej do obrony.

Podsumowanie rozprawy doktorskiej

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Morzywołek, przyznaję, że Doktorantka wykonała ciekawą pracę badawczą, czego dowodem jest to, że udało się z sukcesem opublikować większość wyników: *Morzywołek et al., Novel lytic enzyme of prophage origin from Clostridium botulinum E3 strain Alaska E43 with*



ZAKŁAD BIOLOGII PATOGENÓW I IMMUNOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 90
zbp@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

bactericidal activity against clostridial cells. Int J Mol Sci. 2021 Sep 2;22(17):9536. doi: 10.3390/ijms22179536 (IF 5,923; 140 punktów MEiN).

Rozprawa została napisana przejrzysto pod względem edytorskim i językowym. Pani mgr Agnieszka Morzywołek wykazała się dużymi umiejętnościami stosowania metod i technik badawczych w zakresie biologii molekularnej, analiz strukturalnych *in silico* oraz mikrobiologii. Poza tym, pozostała aktywność naukowa Kandydatki, w tym udział w projektach badawczych, i publikacjach, oraz umiejętność współpracy z naukowcami z ośrodków zagranicznych, świadczy o jej dojrzałości naukowej i zaangażowaniu badawczym. Jeśli Pani Agnieszka wybierze ścieżkę kariery naukowej to jej zespół wzmocni się o dociekliwego badacza.

Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam na ręce Pana dr hab. Mariusza Grinholca, prof. UG, Przewodniczącego Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Morzywołek do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595) i jednocześnie ujętym w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 179. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.).

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa