



**Politechnika Łódzka**  
**Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności**

**Dr hab. inż. Anna Bujacz prof. Uczelni**  
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej  
Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź  
Tel. 042-631-43-31, 042-631-43-94  
e-mail: anna.bujacz@p.lodz.pl

Łódź, 9.02.2023r



**Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Biniek-Antosiak pt. „Structural studies of chitinolytic enzymes from *Pyrococcus chitonophagus*”**

Praca doktorska pani Katarzyny Biniek-Antosiak została wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, w Zakładzie Struktury i Funkcji Biomolekuł kierowanym przez prof. dr hab. Wojciecha Rypniewskiego, promotora pracy. Praca ta dotyczy jednej z głównych tematów badawczych realizowanych w tym zespole i obejmuje badania strukturalne i funkcjonalne enzymów uczestniczących w szlaku degradacji chityny. Praca doktorska poświęcona jest pierwszym czterem enzymom tego szlaku; dwóm różnym chitynazom (CH16\_B1, CH19\_K3), deacetylazie diacetylochitobiozy (Dac-74) i egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazie (GlmA-01), pochodzącym z termofilnego organizmu *Pyrococcus chitonophagus* wykrytego w podwodnych gejzerach u wybrzeży Meksyku.

Praca doktorska pani Biniek-Antosiak obejmuje wszystkie etapy procesu wyznaczenia struktury, począwszy od opracowania systemu ekspresji białka, oczyszczania i krystalizacji, poprzez niskotemperaturowe pomiary dyfrakcyjne, rozwiązanie problemu fazowego w oparciu o rozpraszanie anomalne i podstawienie cząsteczkowe, a kończące się udokładnieniem struktury krystalicznej, depozycją w PDB i analizą funkcjonalną.

Praca napisana jest w języku angielskim, ma klasyczny układ i składa się z następujących rozdziałów: Celu pracy, Wstępu literaturowego, Materiałów i metod, Opisu procedur eksperymentalnych, Opisu rezultatów i dyskusji wyników, Podsumowania, Streszczenia w języku polskim i Bibliografii oraz Listę stosowanych skrótów, ułatwiająca śledzenie treści pracy.

Bardzo przejrzysto zdefiniowany jest cel i zakres pracy. We Wstępie pani Katarzyna Biniek-Antosiak opisuje kolejno: ekstremofile, termofile, modelowy organizm *Pyrococcus chitonophagus* z którego wykorzystano sekwencje genów kodujących badane enzymy, budowę chityny, enzymy ekstremofilne, enzymy chitynolityczne, chitynazy, deacetylazę diacetylochitobiozy oraz egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazę.

Opis chityny z uwzględnieniem różnic strukturalnych pomiędzy trzema różnymi formami tego biopolimeru uświadamia czytelnikowi, iż enzymy procesujące różne formy chityny mogą

wykazywać zróżnicowaną specyfikę substratową i wykazywać większą reaktywność do określonej formy lub produktu hydrolizy powstałego z danego wariantu chityny. Szczególnie przydatny do zrozumienia dalszych części pracy jest opis szlaku metabolicznego degradacji chityny i wykorzystania produktów tej degradacji jako substancji energetycznych, dzięki hydrolizie powstałych dwucukrów (GlcN-GlcN lub GlcN-GlcNAc) do glukozoaminy przez deacetylazę diacetylochitobiozy i egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazę. W kolejnych etapach GlcN poddana reakcjom enzymatycznym z wykorzystaniem kolejno: ADP-zależnej kinazy D-glukozoaminy, deaminazy 6-fosforo-glukozoaminy i ADP-zależnej fosfofruktokinazy staje się użytecznym substratem energetycznym w formie fruktozo-1,6-bisfosforanu.

Na zakończenie części literaturowej Doktorantka opisuje badane w ramach pracy doktorskiej enzymy: deacetylazę diacetylochitobiozy i egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazę, uwzględniając preferencje substratowe obu enzymów i ich wstępną klasyfikację.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka omawia procedury związane z nadprodukcją białka w komórkach bakteryjnych *E. coli* linii BL21, ale informacje na temat gatunku bakterii znalazłam dopiero w opisie eksperymentu. Opisy obejmują amplifikację białka techniką PCR, konstrukcję wektorów ekspresyjnych, klonowanie sekwencji kodującej do wektora pET151/D-topo (który zawiera kowalencyjnie przyłączoną DNA topoizomerazę), i w końcu sam proces nadprodukcji białka. W kolejnych paragrafach opisany jest proces oczyszczania i sposoby kontroli czystości preparatu przed krystalizacją.

W krystalograficznej części metodyki opisana jest krystalizacja badanych białek, eksperyment dyfrakcyjny, rozwiązanie problemu fazowego i udokładnianie struktury. Na zakończenie rozdziału opisane są dodatkowe metody niskokątowego rozpraszania promieni Roentgena na roztworach białek, różnicowa kalorymetria skaningowa oraz oprogramowanie użyte w trakcie realizacji pracy. Opisy użytych metod są przejrzyste z odpowiednim rozwinięciem zagadnień niezbędnych do zrozumienia podstaw poszczególnych procedur. Opis wykonanych eksperymentów odpowiada kolejności procedur opisanych w metodyce, w odniesieniu do poszczególnych badanych enzymów: chitynaz CH16\_B1 i CH19\_K3, deacetylazy diacetylochitobiozy (Dac-74) oraz exo- $\beta$ -D-glukozaminidazy (GlmA-01). Procedury klonowania, nadprodukcji, izolacji oraz oczyszczania opisane są dla wszystkich czterech badanych białek, natomiast dalsze etapy określania struktury krystalicznej, czyli krystalizacja, rozwiązanie problemu fazowego i udokładnianie struktur jest opisane tylko dla dwóch ostatnich enzymów. Byłabym wdzięczna za wyjaśnienie, jak zakończyły się próby krystalizacji chitynaz, czy w większości warunków powstawały bezpostaciowe osady, czy gdzieś można było dopatrzeć się mikrokryształicznych form. Z załączonych chromatogramów i żeli elektroforezy SDS-PAGE wynika, że preparat białkowy był czysty i homogenny. W przypadku uzyskania form mikrokryształicznych lub polikryształicznych można byłoby ich użyć do zarodkowania *in situ*.

Próby modelowania struktur chitynaz zostały opisane w rozdziale dotyczącym krystalizacji, myślę, że fragment ten mógł być wyodrębniony w oddzielnym rozdziale. Modelowanie to nie zakończyło się powodzeniem i pokazuje, jak bardzo oprogramowanie AlphaFold2 jest zależne od danych eksperymentalnych homologicznego białka. Mam nadzieję, że mimo zakończenia projektu doktorskiego, prace nad uzyskaniem struktury krystalicznej tych dwóch interesujących enzymów będą kontynuowane przez panią Katarzynę lub innego członka grupy prof. Rypniewskiego, tym bardziej, że procedury otrzymania odpowiednich preparatów białkowych zostały bardzo dobrze opracowane.

Dane dyfrakcyjne dla trzech form krystalicznych deacetylazy diacetylochitobiozy (Dac-74, Dac-74-anom i Dac-74-lig) i egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazy (GlmA-01) zebrano na linii P13 synchrotronu PETRA III w ośrodku DESY, Hamburg, Niemcy. Rozdzielczość danych dyfrakcyjnych zawiera się w przedziale od 2.1 do 3.08 Å. Dane dyfrakcyjne są przetworzone dość restrykcyjnie, gdyż  $I/\sigma$  dla najwyższego przedziału rozdzielczości dla trzech struktur jest powyżej 2. Obecnie często podchodzi się łagodniej do tego kryterium, uwzględniając mniej restrykcyjny parametr CC1/2. W przypadku deacetylazy diacetylochitobiozy zebrano dane dyfrakcyjne dla trzech form krystalicznych, w tym jedną dla kryształu kompleksu białka z ligandem. Wykorzystano fakt, że białko koordynuje atomy cynku i strukturę Dac-74 - anom rozwiązano za pomocą dyfrakcji anomalnej przy pojedynczej długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji dla tego metalu. Anomalna mapa różnicowa pozwoliła na jednoznaczłą lokalizację atomów cynku w strukturze. Pozostałe dwie formy krystaliczne rozwiązano poprzez podstawienie cząsteczkowe, używając jako modelu analogicznego enzymu z *Pyrococcus furiosus* o kodzie dostępu 4XM0. Również strukturę egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazy rozwiązano poprzez podstawienie cząsteczkowe, wykorzystując jako model strukturę glikozydazy z *Pyrococcus horikoshii* o kodzie dostępu 5GSL. Doktorantka nie podała jakie było podobieństwo sekwencyjne pomiędzy modelem, a badanym białkiem. Informacja ta byłaby bardzo interesująca, szczególnie dla GlmA-01 gdzie wykorzystany model jest strukturą enzymu o innej specyfice substratowej.

Struktury krystaliczne zostały udokładnione do bardzo dobrych parametrów statystycznych, jedynie struktura Dac-74-anom ma nieco wyższy wskaźnik rozbieżności R i  $R_{\text{free}}$ . Patrząc na parametry obróbki danych dla tej struktury jestem ciekawa, czy parametr  $R_{\text{merge}}$  został uzyskany gdy pary Friedla były uśredniane, czy gdy były skalowane oddzielnie.

Struktury enzymu Dac-74 zostały określone w trzech różnych grupach przestrzennych. We wszystkich formach obecna jest struktura heksameru, którą można również zdefiniować jako dimer-trimerów. Zachowanie tej samej formy oligomerycznej potwierdza, że jest to aktywna fizjologicznie forma enzymu. Oligomeryzacja w roztworze została potwierdzona z użyciem niskokątowego rozpraszania promieni Roentgena na roztworach białek. Budowa monomeru

białka Dac-74 została określona jako typowa struktura  $\alpha/\beta$  z siedmioniciowym centralnym arkuszem  $\beta$  o architekturze mieszanej z dominującą przewagą struktur równoległych (tylko jeden z łańcuchów jest antyrównoległy). Struktury z ligandem, pełniącym funkcję kofaktora, pozwoliły jednoznacznie zdefiniować położenie centrum aktywnego i rolę poszczególnych reszt aminokwasowych w koordynacji metalu i wiązaniu substratu. Pani Katarzyna Biniek-Antosiak wykazała, że sposób wiązania substratu przez Dac-74 jest analogiczny do esteraz węglowodanowych z rodziny CE-14 i dwucukier wiązany jest w kieszeni aktywnej końcem nieredukującym, a hydroliza grupy acetylowej zachodzi tylko na jednym z pierścieni. Taki sposób wiązania substratu i przebiegu reakcji potwierdza kształt gęstości elektronowej dla ligandu. Gęstość elektronowa, mimo słabej rozdzielczości danych dyfrakcyjnych, jest bardzo dobrze zdefiniowana dla aminoacetylowanej reszty cukrowej, ale jest mocno zredukowana dla drugiej reszty, co świadczy o jej słabszym związaniu i labilności konformacyjnej. Wykazano, że możliwe są dwa alternatywne mechanizmy reakcji: pierwszy, w którym nukleofilem jest grupa karboksylowa kwasu glutaminowego i powstaje kowalencyjnie związany pośredni produkt reakcji i drugi, gdzie nukleofilem jest cząsteczka wody. Badania strukturalne zostały uzupełnione o badanie aktywności enzymatycznej. Pozwoliło to na pełną charakterystykę strukturalną i funkcjonalną badanej deacetylazy diacetylchitobiozy.

Struktura egzo- $\beta$ -D-glukozaminidazy (GlmA-01) została określona w układzie rombowym, w grupie przestrzennej C222<sub>1</sub> z jedną cząsteczką w części niezależnej. Funkcjonalny dimer białka jest odtworzony przez cząsteczkę generowaną przez krystalograficzną oś dwukrotną. Mam pytanie, która z osi dwukrotnych, wzdłuż kierunku *a* czy *b* jest odpowiedzialna za tworzenie dimerów. Dimer białka jest podobny do struktury białka użytego jako model w podstawieniu cząsteczkowym, o kodzie PDB: 5GMS, w którym funkcyjny dimer stanowił część niezależną. Monomer białka zbudowany jest z trzech domen: N-terminalnej katalitycznej o zwoju typu TIM-barel, środkowej domeny  $\alpha/\beta$  i C-końcowej o architekturze  $\beta$ . Dwa centra aktywne ulokowane są w głębokiej wnęce na styku dwóch monomerów. Położenie centrum aktywnego i oddziaływania z produktem reakcji zostały ustalone na podstawie wspomnianej wcześniej wysokorozdzielczej struktury 5GMS. Obecne w centrum aktywnym cząsteczki wody mają pozycję analogiczną do grup hydroksylowych ligandu w strukturze kompleksu, a wszystkie reszty aminokwasowe centrum aktywnego są jednakowe w obu strukturach. Analiza strukturalna białka pozwoliła na zaklasyfikowanie tego enzymu do hydrolaz glikozydowych rodziny 34 (GH34). Badania strukturalne uzupełniono o wstępne badania enzymatyczne, w których wykazano aktywność tylko względem jednego substratu GlcN-GlcNAc, co świadczy o wysokiej specyficzności substratowej enzymu. Bardziej szczegółowe prace nad charakteryzacją enzymatyczną zostały wstrzymane ze względu na niemożność zakupu jednego z odczynników wycofanego z rynku. Jeśli dostępne są dobrze

zachowane kryształy formy apo, to może warto spróbować uzyskać strukturę kompleksu GlmA-01 z produktem reakcji, w procesie namaczania lub powtórzyć krystalizację z ligandem.

Uważam, że przedstawiona praca doktorska dostarcza nowych informacji na temat enzymów zaangażowanych w proces degradacji chityny. Enzymy te mogą znaleźć potencjalne zastosowanie biotechnologiczne, gdyż produkty degradacji chityny mogą zostać ponownie użyte do wytwarzania szerokiej gamy biodegradowalnych polimerów. Praca napisana jest bardzo zwięźle; 94 strony, w tym 10 stron bibliografii, zawierającej 52 odnośniki literaturowe. Liczba cytowanych pozycji w Bibliografii jest raczej niska jak dla prac doktorskich. Zdarzyły się w niej błędy edycyjne, m.in. publikacja Kurita Keisuke jest błędnie cytowana, powinno być: Kurita, Keisuke. 2001. Controlled Functionalization of the Polysaccharide Chitin. *Progress in Polymer Science* 26(9): 1921-1971. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7).

W podsumowaniu stwierdzam, że pani mgr Katarzyna Biniek-Antosiak przedstawiła rozprawę doktorską posiadającą wysokie walory poznawcze. Doktorantka wykazała wiedzę z zakresu badań strukturalnych białek i umiejętności wykorzystania uzyskanych informacji strukturalnych w celu wyjaśnienia właściwości fizycznych badanych enzymów. Dysponuje pogłębioną wiedzą w dziedzinie krystalografii, jak również metod stosowanych w biologii molekularnej. Stosując różnorodne metody badawcze wykazała się dużą konsekwencją w dążeniu do postawionego naukowego celu. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią niewątpliwie nowość naukową.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Biniek-Antosiak spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 r., nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku, w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261), W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie panią mgr Katarzynę Biniek-Antosiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

