

Poznań, 22 lutego 2023 r.

Prof. dr hab. Maria Gdaniec
Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
61-614 Poznań

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Biniek-Antosiak zatytułowanej 'Structural studies of chitinolytic enzymes from *Pyrococcus chitonophagus*'

Chityna, czyli β -(1-4)-poli-N-acetylo-D-glukozamina, jest drugim po celulozie najpowszechniej występującym w przyrodzie polisacharydem. W porównaniu z celulozą chityna oraz produkt jej deacetylacji, chitosan, wykorzystywane są przez człowieka tylko w ograniczonym zakresie. Archeony, bakterie i w mniejszym stopniu również grzyby przetwarzają chitynę, która jest dla nich źródłem energii oraz mikroelementów. Mikroorganizmy te w celu degradacji chityny wykorzystują specjalne enzymy takie jak chitynazy i deacetylazy. Od szeregu lat badania nad enzymami chitynolitycznymi prowadzone są w grupie prof. dr hab. Wojciecha Rypniewskiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Celem realizowanego przez niego projektu badawczego jest stworzenie multienzymu nazwanego, przez analogię z celulosomem, sztucznym chitynosomem, który byłby w stanie degradować chitynę efektywniej niż mieszanka pojedynczych enzymów. Racjonalna realizacja tego celu wymaga poznania struktury, właściwości katalitycznych oraz stabilności poszczególnych enzymów uczestniczących w procesie degradacji chityny. Właśnie w ten etap badań wpisuje się recenzowana przez mnie rozprawa doktorska mgr Katarzyny Biniek-Antosiak, której promotorem jest prof. dr hab. Wojciech Rypniewski a promotorem pomocniczym dr Magdalena Bejger. Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy były finansowane z projektów FNP Mistrz 2014 oraz NCN Opus 14 (2017/27/B/NZ1/02201). Enzymy chitynolityczne, którymi zajęła się Doktorantka pochodzą z hipertermofilnego archeonu *Pyrococcus chitonophagus*. Jedną z podstawowych zasad biologii molekularnej mówi, że niemożliwe jest zrozumienie reakcji zachodzących w układach biologicznych bez poznania i zrozumienia budowy uczestniczących w nich cząsteczek. Stąd też celem pracy Doktorantki było przeprowadzenie badań strukturalnych białek ze szlaku degradacji chityny z wyżej wspomnianego mikroorganizmu ekstremofilnego. Na badane przez nią białka składają się dwie chitynazy (CH16_B1, CH19_K3), deacetylaza diacetylochitobiozy (Dac-74) oraz egzo- β -D-glukozaminidaza (GlmA-01). Doktorantka miała przeanalizować uzyskane wyniki pod kątem relacji między strukturą enzymów a ich właściwościami i funkcją. Struktury trójwymiarowe białek określać można

wykorzystując kilka technik eksperymentalnych, jednakże rentgenowska analiza strukturalna jest podstawową metodą badawczą biologii strukturalnej i tę metodę zastosowała Doktorantka w swoich badaniach. Badania krystalograficzne uzupełniała, gdy to było potrzebne, o takie metody jak SAXS, NMR, ITC czy DSC. Badania DSC prowadziła samodzielnie a pozostałe we współpracy.

Jeśli chodzi o stronę formalną, rozprawa mgr Katarzyny Biniek-Antosiak jest opracowaniem o tradycyjnym układzie przygotowanym w języku angielskim i liczącym 91 stron. Zawiera ona wszystkie niezbędne elementy a więc spis treści, wykaz stosowanych skrótów, cel pracy, wprowadzenie, stosowane materiały i metody, część eksperymentalną, wyniki wraz z dyskusją, podsumowanie, streszczenie w języku polskim oraz bibliografię liczącą 52 pozycje. Od strony technicznej praca została przygotowana dość dobrze a niektóre usterki edycyjne, które spostrzegłam w trakcie czytania rozprawy wymienię pod koniec recenzji. Język pracy jest zwięzły, ilustracje i schematy dobrze przygotowane. Dodam, że dane strukturalne dla trzech z czterech prezentowanych w pracy struktur kryształów zostały zdeponowane w bazie PDB. Wyniki pracy dotyczące badań nad deacetylazą N,N-diacetylochitobiozy zostały opublikowane w 2022 r. w *Int. J. Mol. Sci* i Doktorantka jest pierwszym autorem pracy.

Pierwszy obszerniejszy rozdział rozprawy zatytułowany 'Wprowadzenie' zapoznaje czytelnika z zagadnieniami związanymi z tematyką pracy. Doktorantka omawia pokrótce ekstremofile, enzymy ekstremofilne, chitynę i enzymy chitynolityczne, przy czym bardziej szczegółowo chitynazy, deacetylazę N,N-diacetylochitobiozy oraz egzo- β -D-glukozaminidazę. Wziąwszy pod uwagę cel pracy, zabrakło mi w tym opracowaniu bardziej szczegółowej informacji o obecnym stanie wiedzy o strukturze i mechanizmie działania trzech typów badanych przez Doktorantkę enzymów. Mam również pytanie do rys. 3 na stronie 15. Rysunek ten sugeruje, że łańcuchy polisacharydowe w trzech różnych formach strukturalnych chityny α , β i γ mają różne formy konformacyjne podczas gdy z opisu wynika, że różnice te wynikają jedynie z różnego ułożenia łańcuchów o tej samej budowie. Czy faktycznie łańcuchy chityny mają budowę taką jak na rysunku? Skąd zaczerpnięty został ten rysunek?

W części metodycznej mgr Katarzyna Biniek-Antosiak omawia stosowane w pracy eksperymentalnej metody biochemiczne (użyty system ekspresyjny, oczyszczanie białka, sprawdzanie jakości preparatu, krystalizację białka) oraz pokrótce metodykę badań biokrystalograficznych (pomiar dyfrakcyjny, rozwiązywanie problemu fazowego, udokładnianie struktury i ocena jej jakości). W tym krótkim opracowaniu zaniepokoiły mnie zamieszczone błędne objaśnienia pod wzorem (1) na gęstość elektronową w kryształach i brak współczynnika proporcjonalności we wzorze (2). Doktorantka omawia również krótko metody SAXS (małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich) oraz DSC (różnicowa kalorymetria skaningowa). Jak widać mgr Katarzyna Biniek-Antosiak stosowała w swojej pracy szeroki wachlarz metod biochemicznych a ponadto musiała zapoznać się z nietłymi zagadnieniami rentgenowskiej analizy strukturalnej biomolekuł. Realizacja postawionych przed nią zadań wymagała

również umiejętności posługiwania się szeroką gamą specjalistycznego oprogramowania komputerowego oraz analizy baz danych.

Rozdział 5 rozprawy dotyczy procedur eksperymentalnych stosowanych w pracy. Materiał genetyczny dla *Pyrococcus chitonophagus* otrzymany został od prof. C.E. Vorgiasa z Uniwersytetu w Atenach. W genomie tego mikroorganizmu Doktorantka zidentyfikowała 37 genów kodujących białka, które mogły być zaangażowane w degradację chityny i wybrała z nich cztery do dalszych badań laboratoryjnych. Dla każdego z nich przeprowadziła klonowanie i przygotowała wektor ekspresyjny do produkcji białka oraz opracowała również metodę ich oczyszczania. Krystalizacja zakończyła się sukcesem dla dwóch z badanych enzymów, deacetylazy diacetylochitobiozy (Dac-74) oraz egzo- β -D-glukozaminidazy (GlmA-01). W przypadku dwóch pozostałych enzymów, chitynaz CH19_K3 i CH16_B1, wszystkie próby krystalizacyjne zakończyły się niepowodzeniem. Dla Dac-74 Doktorantka otrzymała trzy różne formy krystaliczne: Dac-74 (P3₂2₁1), Dac-74-lig z diacetylochitobiozem jako ligandem (P2₁) oraz Dac-74-anom (P2₁2₁2₁), specjalnie oczyszczone białko do pomiarów anomalnej dyspersji, zawierające jony cynku. W przypadku GlmA-01 otrzymała jedną formę krystaliczną należącą do grupy przestrzennej C222₁ natomiast nie zdołała otrzymać kryształów tego białka w kompleksie z ligandem. Pomiary dyfrakcyjne dla otrzymanych kryształów wykonane zostały na synchrotronie DESY w Hamburgu a problem fazowy rozwiązany został metodą podstawienia cząsteczkowego z wykorzystaniem programu Phaser. Do modelowania struktur i ich udokładniania Doktorantka stosowała programy Coot oraz Refmac5. Masy cząsteczkowe badanych białek wynoszą 31 kDa (Dac-74) oraz 91kDa (GlmA-01). Rozdzielczość danych dyfrakcyjnych dla badanych struktur mieści się w granicach od 2.1 Å (GlmA-01) do 3.08 Å (Dac-74-lig).

Kolejny rozdział rozprawy zatytułowany 'Wyniki i dyskusja' składa się z dwóch odrębnych części poświęconych dwom badanim krystalograficznie enzymom, deacetylazie diacetylochitobiozy (Dac-74) oraz egzo- β -D-glukozaminidazie (GlmA-01), przy czym część druga jest znacznie skromniejsza. Badania krystalograficzne pokazały, że metaloenzym Dac-74 w trzech badanych formach krystalicznych występuje zawsze w postaci heksamery o symetrii niekrystalograficznej D₃. Szkoda, że w swojej pracy Doktorantka informację o symetrii aglomeratu Dac-74 pomija. Asymetryczne części komórek elementarnych zawierają różne liczby jednostek heksamerycznych. W Dac-74 jest to połowa heksamery, w Dac-74-anom jeden heksamery a w Dac-74-lig aż trzy jednostki heksameryczne. Oligomeryczna struktura Dac-14 w roztworze potwierdzona została metodą SAXS, która wskazała, że zdecydowanie przeważającą formą jest heksamery, jednakże możliwe są również wyższe oligomery. We wszystkich formach krystalicznych jedna cząsteczka Dac-74 wiąże jeden jon cynku, co zostało potwierdzone poprzez pomiar profilu absorpcji promieniowania rentgenowskiego dla Dac-74-anom oraz metodą ITC, która pokazała, że również jony kadmu i niklu mają podobne powinowactwo do Dac-74. Jon metalu związany jest przez zachowawczą triadę His-Asp-His, która, jak podkreśla Doktorantka, jest charakterystyczna dla rodziny 14 esteraz węglowodanowych (CE-

14). W kryształach Dac-74-lig jako ligand występuje N,N'-diacetylochitobioza (GlcNAc)₂. Mimo niskiej rozdzielczości tej struktury gęstość elektronowa w obszarze wiążącym ligand była widoczna dla 12 symetrycznie niezależnych cząsteczek Dac-74 i pozwoliła ustalić, że dicukier jest zwrócony nieredukującym końcem do miejsca aktywnego w kieszeni wiążącej, tak jak to się dzieje dla enzymów z rodziny CE-14. Należy tutaj podkreślić, że to stosunkowo rzadki przypadek by w kryształach substrat znajdował się w formie nieprzetworzonej w centrum aktywnym enzymu. Doktorantka wyjaśnia ten fakt warunkami odbiegającymi istotnie od optymalnych dla aktywności hipertermofilnego enzymu oraz dużym nadmiarem liganda w układzie krystalizacyjnym i krioprotekcyjnym. We wszystkich strukturach Dac-74 jony cynku miały liczbę koordynacyjną 4, trzy miejsca wiążące w tetraedrze wokół cynku były wykorzystane przez zachowawczą triadę His-Asp-His a czwarte przez cząsteczkę wody w przypadku niezwiązanego białka, lub atom tlenu grupy acetylowej substratu w przypadku Dac-74-lig. Po związaniu liganda struktura białka zmieniała się nieznacznie. W oparciu o zebrane dane strukturalne na temat Dac-74 Doktorantka zastanawiała się nad możliwym mechanizmem reakcji deacetylacji katalizowanej przez ten enzym. Na podstawie badań strukturalnych, z dwóch proponowanych w literaturze mechanizmów, jako bardziej prawdopodobny uznała ten, w którym w wyniku ataku grupy karboksylanowej reszty glutaminowej enzymu na grupę karbonylową acetylu w substracie powstaje bezwodnik jako produkt pośredni. Nie wyklucza jednak mechanizmu alternatywnego, hydrolitycznego, chociaż w badanej strukturze nie znalazła cząsteczki wody, która mogłaby pełnić funkcję hydrolityczną. Zdaje sobie natomiast sprawę, że przed reakcją enzymatyczną może dojść do przebudowy struktury, która ułatwi penetrację cząsteczki wody do miejsca reakcji, czego statyczny obraz struktury kryształu nie jest w stanie zilustrować. Badania aktywności enzymatycznej prowadzone z wykorzystaniem metod ITC oraz NMR pokazały, że enzym wykazuje duże powinowactwo do diacetylowanego disacharydu (GlcNAc)₂ i usuwa grupę acetylową tylko z końca nieredukującego cukru. Mniejsze powinowactwo enzym ten wykazywał do trimeru (GlcNAc)₃ oraz monomeru czyli N-acetylo-D-glukozyaminy GlcNAc.

Drugim badanym przez Doktorantkę enzymem z *Pyrococcus chitonophagus* była egzo-β-D-glukozaminidaza (GlmA-01). Badania strukturalne pozwoliły Doktorantce stwierdzić, że enzym ten występuje w kryształach w postaci symetrycznego dimerycznego asocjatu a w budowie pojedynczej cząsteczki można wyodrębnić trzy różne domeny. Tak więc struktura GlmA-01 okazała się podobna do struktur wcześniej opublikowanych trzech egzo-β-D-glukozaminidaz pochodzących również z organizmów termofilnych. Uzyskana informacja pozwoliła Doktorantce przypisać badany enzym do rodziny 35 hydrolaz glikozydowych (GH-35). Podobnie jak w przypadku Dac-74, mgr Katarzyna Biniek-Antosiak zauważyła, że do zaobserwowania aktywności hipertermofilnego enzymu GlmA-01 konieczne było jego ogrzewanie przez 50 minut w 60°C, proces który określiła mianem 'wyżarzania'. Badań aktywności GlmA-01 metodą ITC nie zdołano jednak w pełni przeprowadzić ze względu na wycofanie z

rynku potrzebnych do badań monoacetylowanych substratów. Obecnie nie wiadomo więc na ile enzym ten jest specyficzny. Wstępne dane wskazały, że powinien on uzupełniać aktywność Dac-74, gdyż wykazywał pewną aktywność względem produktu tego enzymu, monoacetylowanego dicukru GlcN-GlcNAc.

Podsumowując, za najważniejsze wyniki tej rozprawy uważam:

- a) opracowanie metod otrzymywania i oczyszczania czterech enzymów chitynolitycznych z *Pyrococcus chitonophagus*, wystarczających do zdegradowania chityny do glukozaminy,
- b) dostarczenie bogatej informacji strukturalnej o deacetylazie diacetylochitobiozu poprzez określenie struktury kryształu tego enzymu w formie niezwiązanej i związanej z substratem, wskazanie bardziej prawdopodobnego mechanizmu reakcji deacetylacji dla tego enzymu oraz zbadanie aktywności enzymu,
- c) otrzymanie kryształów i określenie struktury egzo- β -D-glukozaminidazy oraz uzyskanie wstępnych danych o jej aktywności.

Na koniec pozwolę sobie wypunktować niektóre z błędów edycyjnych, które spostrzegłam w czasie czytania rozprawy:

1. Wykaz odnośników, chociaż krótki, nie został starannie przygotowany. Zamiast nazw czasopism pojawiają się w pewnych przypadkach jakieś dziwne oznaczenia (Issn??), czasami brak stron, podany jest odnośnik do BioRxiv podczas gdy praca jest już opublikowana, dwa odnośniki Goodey i Kurita zawierają tytuł pracy i nic więcej. W odnośniku Kuwmanda et al. do tytułu pracy doczepiono tekst 'Submit a paper'. Ponadto po raz pierwszy spotkałam się z takim zapisem odnośników, w którym pierwszego autora podaje się w kolejności nazwisko i imię natomiast dla pozostałych na odwrót, imię i nazwisko. Na str. 53 pojawił się odnośnik do Horiuchi et al., 2016 ale brak tego odnośnika w spisie literatury.
2. Na schematycznym rys. 30 His259, Gly255, Arg88 mają źle zaznaczone typy wiązań chemicznych lub zły typ atomu.
3. W wykazie skrótów brak opisu dla ITC (izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne)

Nie ulega wątpliwości, że recenzowana rozprawa mgr Katarzyny Biniek-Antosiak poszerza naszą wiedzę o strukturze i działaniu enzymów chitynolitycznych a przedstawione wyniki reprezentują wysoki poziom i wskazują na znaczną wiedzę Doktorantki z zakresu biochemii i biokrytalografii. Mgr Katarzyna Biniek-Antosiak opanowała szereg metod badawczych i jest dobrym eksperymentatorem. W oparciu o przedstawioną powyżej opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Biniek-Antosiak spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o

stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. 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) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Katarzyny Biniek-Antosiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marcel Gdaniak