

### Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Dagmary Głód pt. „Ocena przydatności ukierunkowanej ewolucji molekularnej i racjonalnego projektowania białka enzymatycznego w doskonaleniu właściwości lipazy A z *Candida antarctica*”. Praca została wykonana w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Bednarskiego.

Lipazy odkryto wcześniej niż skonstruowano samochody. Przez pierwsze, po odkryciu, kilkadziesiąt lat, w odróżnieniu od samochodów, nie spożytkowano tego faktu. Nawet prace naszego rodaka prof. Ernesta Syma (lata 30-ste XX w.) udowodniające wprost nadzwyczajne i fenomenologiczne właściwości lipaz w środowisku niewodnym nie zostały dostrzeżone i docenione. Świat miał ważniejsze sprawy. Dopiero lata 60-sięte przyniosły wzrost zainteresowania lipazami. Udowodniono, że lipazy wykazują właściwości katalityczne predysponujące je do wykorzystania w wielu dziedzinach przemysłu.

Obecnie przychody związane z produkcją i zastosowaniem tej grupy enzymów należą do jednych z najwyższych w branży, a przecież nowa dziedzina biotechnologii przemysłowej, wykorzystująca środowiska wody i innych rozpuszczalników do aplikacji lipaz wystartowała stosunkowo niedawno, stanowiąc niezwykle atrakcyjną przemysłowo odnogę biorafinacji. W kraju nieliczne ośrodki naukowe zajmują się tematyką otrzymywania lipaz i ich wykorzystania w chemicznej katalizie. Po prawdzie to właśnie Profesor Włodzimierz Bednarski w znaczący sposób przyczynił się do rozwoju tej dziedziny w Polsce.

Rozwijająca się dynamicznie inżynieria białka pozwala na otrzymanie enzymów o nowych zaplanowanych właściwościach. Metody ukierunkowanej ewolucji molekularnej umożliwiają wytworzenie enzymów o udoskonalonych właściwościach poprzez losowe zmiany w sekwencji nukleotydowej, których efekty testowane są metodami selekcji i skriningu. Nieustannie doskonalone, zaawansowane narzędzia bioinformatyczne pozwalają na coraz powszechniejsze stosowanie metod modelowania molekularnego i racjonalnego projektowania biokatalizatorów. Jest to nie tylko interesująca tematyka badań, ale i bardzo perspektywiczna, także w kontekście niebezpieczeństwa spożywania kwasów tłuszczowych

*trans* (TFA), które powstają jako produkty uboczne w procesach przetwórczych olejów roślinnych. Jak słusznie zauważa mgr Dagmara Głód „procesy enzymatyczne z użyciem selektywnych substratowo lipaz mogłyby umożliwić zastąpienie procesów chemicznych i opracowanie metod produkcji tłuszczów jadalnych pozbawionych szkodliwych izomerów *trans* kwasów tłuszczowych”. Kontynuując myśl można domniemywać, iż skonstruowanie lipaz o wysokiej aktywności i specyficzności względem izomerów *trans*- (co jest bardzo rzadko podejmowanym wyzwaniem) umożliwi wytworzenie nowych, wyspecjalizowanych narzędzi do....? Proponuję aby Pani mgr Dagmara Głód szerzej rozwinęła ten problem podczas obrony doktoratu.

Badania, w tej dziedzinie, prowadzone w Katedrze Biotechnologii Żywności uważam za wyróżniające, niezwykle interesujące i potrzebne. Kiedy badacz sam doskonali enzym, w celu jego konkretnego zastosowania jako katalizatora, wytwarza się rodzaj pozytywnej interakcji, dzięki której poznaje on problemy, ich niuanse, od podstaw, niejako po obu stronach „barykady”.

Recenzowana praca doktorska Pani mgr Dągmary Głód posiada typowy układ rozpraw doktorskich. Manuskrypt został napisany na 132 stronach maszynopisu. Zapleczem merytorycznym jest bibliografia zawierająca ponad 155 pozycji literaturowych.

Rozdział 1 stanowi Wstęp, w którym doktorantka, w skondensowanej formie, wprowadza nas w dziedzinę wykonywanych badań. Wymienia pryncypia, opisuje fakty znane, wspomina o tych jeszcze nie poznanych, wskazuje na potrzebę i ukazuje przyczynę wyboru kierunku swoich badań.

Rozdział 2, „Zagadnienie w świetle literatury”, zajmujący 30 stron, wprowadza czytelnika w tematykę badań. Autorka omawia w nim: właściwości katalitycznych lipaz; pojęcie ewolucji *in vivo* i *in vitro*; metody selekcji i skryningu stosowane w technikach ukierunkowanej ewolucji molekularnej; lokalizację miejsc mutacji oraz ich wpływ na aktywność katalityczną białek enzymatycznych; metody doskonalenia właściwości katalitycznych lipaz; wybrane techniki ukierunkowanej ewolucji molekularnej oraz opisuje racjonalne projektowanie białka enzymatycznego. Rozdział jest bardzo dobrze napisany w oparciu o wartościowe źródła. Nie dostrzegłem w nim uchybień, może oprócz tego, że chyba zbyt mało miejsca w tym rozdziale zajmuje tematyka dotycząca badań związanych z modyfikacją metodami inżynierii genetycznej lipazy A z *Candida antarctica*, tzn. enzymu którym Autorka zajęła się w swej pracy.

Rozdział 3 zawiera Cel i zakres badań (cytuję za pracą) „Celem przeprowadzonych doświadczeń było opracowanie i ocena przydatności ukierunkowanej ewolucji molekularnej

i racjonalnego projektowania białka enzymatycznego w doskonaleniu właściwości katalitycznych lipazy A z *Candida antarctica*”.

Zakres badań obejmował następujące zadania:

- Opracowanie i optymalizacja etapów tworzenia bibliotek rekombinantów;
- Dobór metod oraz selekcja i skryning uzyskanych mutantów względem aktywności lipolitycznej, w tym względem aktywności wobec izomerów cis/trans dienów kwasu linolowego (CLA);
- Dobór i opracowanie metod bioinformatycznych w modelowaniu właściwości enzymów oraz modyfikacji ich właściwości. Modelowanie molekularne białek enzymatycznych *in silico*. Zastosowanie mutagenyzy punktowej z uwzględnieniem struktury i właściwości enzymów;
- Sekwencjonowanie wybranych genów i analiza uzyskanych danych;
- Zastosowanie zmodyfikowanych enzymów w katalizie wybranych reakcji chemicznych oraz doskonalenie warunków ekspresji białek enzymatycznych.

Postawiony przez doktorantkę cel uważam za bardzo ambitny. Zrealizowany zakres, prawdziwie nowoczesnych, obszernych badań, został doskonale zrealizowany.

Rozdział 4, Materiały i metody, zajmują 23 strony, na których Autorka zamieściła 22 opisy stosowanych w pracy metodyk. To jest następny bardzo dobrze napisany rozdział, w którym zamieszczono opisy działań koniecznych do realizacji postawionego celu, dotyczących: charakterystyki oraz warunków propagowania stosowanego szczepu drożdży; stosowanych procedur mutagenyzy; izolacji i przygotowania genu lipazy A *Candida antarctica* ATCC 28323; klonowania genu lipazy A *Candida antarctica*, w tym izolacji plazmidowego DNA, przygotowania komórek kompetentnych bakterii *Escherichia coli*; modyfikacji genu lipazy A metodą błędnej reakcji łańcuchowej polimerazy (error-prone PCR); selekcji otrzymanych bibliotek transformantów względem aktywności lipolitycznej; ekspresji rekombinowanych białek w mikropłytkach, w tym oznaczania zawartości białka metodą fluorymetryczną; charakterystyki wybranych, zmodyfikowanych lipaz w porównaniu z natywnym białkiem; elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz elektroforetycznej identyfikacji enzymów lipolitycznych (zymogram). Na koniec Doktorantka opisuje zastosowaną metodykę mutacji punktowych. Niestety, po raz kolejny nie mam uwag krytycznych a wręcz z podziwem konstatuje mnogość metod i bioinformatycznych narzędzi które poznała i zastosowała Autorka pracy .

W rozdziale 5, „Omówienie wyników i dyskusja”, na 37 stronach maszynopisu zamieszczono uzyskane rezultaty badań w postaci 42 rysunków i 24 tabel oraz 9 załączników. Rozdział ten zawiera opis badań i ich wyniki wraz z dyskusją, co nieco utrudnia analizę i ocenę pracy wykonanej przez Doktorantkę. Ujmuje ona w tym rozdziale kolejno zagadnienia dotyczące: (1) amplifikacji genu lipazy A i klonowania tego genu do wektora plazmidowego pETBlue-2 oraz selekcji transformantów w komórkach *E.coli* NovaBlue Singles™; (2) modyfikacji genu lipazy A metodą błędnej reakcji łańcuchowej polimerazy (epPCR), klonowania zmodyfikowanych genów oraz wreszcie (3) selekcji i skringu otrzymanyh po trzech kolejnych cyklach epPCR bibliotek transformantów. W ostatnim z wymienionych etapów zastosowano komórki kompetentne *E. coli* Tuner. Selekcje prowadzono metodą dyfuzyjną, stosując jako substraty tributyrinę oraz trioleinę, a także dokonano oceny biokatalitycznych właściwości mutantów względem TAG-CLA. Przeprowadzono też wysokowydajny skring (w mikroplótkach) wybranych transformantów, (uwzględniający zdolność do hydrolizy estrów p-NP krótko-, średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych) oraz wysokowydajny skring mutantów względem estrów p-NP cis- i trans-kwasów tłuszczowych. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje efekty zastosowania **do zmiany selektywności substratowej badanej lipazy A** metody mutacji punktowych. Tę część badań opisuje skupiając się najpierw na modelowaniu molekularnym, do którego wykorzystwała program VMD (Visual Molecular Dynamics) oraz AutoDock 4 (do symulacji dokowania substratów) i w oparciu o dane literaturowe, identyfikowała mutacje aminokwasowe wpływające najkorzystniej na III rzędową konformację tunelu acylowego. Następnie zaproponowała, *in silico*, dwa własne warianty mutacji, polegające na wymianie dwóch różnych par aminokwasów na cysteinę, i wykazała w AutoDock 4 zwężenie wejścia acylowego w obu zaproponowanych mutantach (Phe222Cys\_Val238Cys oraz Ile150Cys\_Thr221Cys). Kolejno opisała efekty wykonanej doświadczalnie mutagenazy ukierunkowanej do zaprojektowanego *in silico* miejsca (**site-directed mutagenesis**), której celem była zamierzona zmiana katalitycznych właściwości lipazy A, oraz podała wyniki sekwencjonowania DNA i analizy uzyskanych sekwencji. Selekcję i skring otrzymanych wariantów lipazy A przeprowadziła – co wynika z opisu - generalnie tymi samymi metodami jak w części badań wykonanych metodą błędnej reakcji łańcuchowej polimerazy (epPCR) lecz stosując trzy typy komórek prokariotycznego gospodarza *E. coli* (Tuner (DE3)pLacI, Origami B (DE3) pLacI i Rosseta-gami B (DE3)pLacI. W selekcji metodą dyfuzyjną zastosowała obok tributyriny i trioleiny dodatkowo olej zawierający 60% izomerów trans, który jednakże nie był hydrolizowany w tych warunkach przez żaden z otrzymanych

mutantów. Opisała następnie efekty dalszego skriningu mutantów lipazy A, względem estrów p-NP krótko-, średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, który wykazał u wybranych mutantów, wyższą aktywność hydrolityczną w porównaniu z białkiem natywnym, preferencję wobec średniołańcuchowego kwasu laurynowego i uzależnienie lokalizacji a także selektywności enzymu od komórek gospodarza. W kolejnym podrozdziale opisuje skrining z użyciem estrów p-NP kwasów: cis-oleinowego, trans-elaidynowego i trans-wakcenenowego wskazujący na 3- i 2-krotne podwyższenie selektywności transformantów Phe149Glu i Phe222Ser wobec izomerów trans w porównaniu z białkiem natywnym. Pierwszy wariant lipazy A sprawdzony w hydrolizie oleju zawierającego 60% izomerów trans wykazał ok. 15-razy wyższą aktywność niż wyjściowy enzym natywny, jednak, niestety niższą niż handlowy preparat lipazy A z firmy Novozyme (Novozym 735). Całość tej części pracy stanowi bardzo obfity materiał doświadczalny i dowodzi, **o czym pisze Autorka we wnioskach**, że procedura epPCR umożliwia otrzymanie bibliotek mutantów (najlepszych przy stosowaniu średniej częstotliwości mutacji) o zmienionej selektywności względem izomerów CLA, zwiększonej aktywności hydrolitycznej wobec TAG-CLA i estrów kwasów tłuszczowych oraz, że modelowanie molekularne wraz z mutagenezą punktową jest dobrym narzędziem do zwiększania selektywności lipazy A wobec izomerów trans.

Reasumując uważam, że omówienie i dyskusja wyników zostały napisane kompetentnie i klarownie choć tekst nie jest wolny od niewielkich nieścisłości (np. stosowanie terminu „specyficzna aktywność” zamiast polskojęzycznego terminu „aktywność właściwa” enzymu) i pomyłek (np. na stronie 102 Autorka powinna odesłać do załączników 7-9 a nie 4-6). Prawidłowość wybranych do dyskusji publikacji, staranność interpretacji oraz jej szeroki zakres świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, łatwości kojarzenia wiedzy „z różnych półek” oraz wyraźnym dążeniu do wytworzenia nowych lipaz o ulepszonych właściwościach katalitycznych.

**Ocena merytoryczna.** Nie zamierzam omawiać szczegółowo zaprezentowanych rezultatów, chciałbym jedynie zwrócić uwagę na te elementy, które w moim przekonaniu, zgodnie z moimi kompetencjami, stanowią najbardziej istotną wartość naukową pracy.

Interesującą cechą lipazy A *Candida antarctica*, wyróżniającą ją spośród innych lipaz, jest selektywność względem *trans* kwasów tłuszczowych. To był doskonały wybór.

W pracy wyselekcjonowano prawidłowy konstrukt, który następnie zastosowano w reakcjach epPCR i mutagenezy ukierunkowanej do miejsca. Indukując przypadkowe mutacje wyeliminowano dużą częstotliwość zmian w sekwencji nukleotydowej na korzyść małej (0-4,5 mutacji/kpz) i średniej (4,5-9 mutacji/kpz). Utworzono bibliotekę mutantów

o różnej częstotliwości mutacji i zmienionej selektywności względem izomerów CLA. Zastosowana metoda umożliwiła jakościową ocenę transformantów, dokonaną metodą dyfuzyjną w podłożu agarowym. Wybrane, według ustalonych kryteriów (hydroliza chociaż jednego ze stosowanych substratów), poddano wysokowydajnej hodowli w mikropłytkach i oceniono ich selektywność względem izomerów cis/transdienów sprzężonego kwasu linolowego (CLA) metodą chromatografii gazowej.

Analiza biblioteki po pierwszym cyklu epPCR genu lipazy A *Candida antarctica* o średniej częstotliwości mutacji, pozwoliła wyselekcjonować klon MA39, który charakteryzował się selektywnością względem izomerów cis-9, trans-11 oraz trans-10, cis-12. Po trzech cyklach epPCR wyselekcjonowany transformant MA39 cechował się zwiększoną selektywnością wobec izomerów cis-9, trans-11 oraz trans-10, cis-12, odpowiednio 12 i 14 razy w porównaniu z lipazą natywną. Mutant ten cechował się 11-krotnie zwiększoną zdolnością hydrolizy substratu (wzrost z 1,1% do 17,1%). Dodatkowo wykonany zymogram wykazał wewnątrzkomórkową lokalizację, w komórkach Tuner, zarówno muteiny MA39 jak i lipazy natywnej.

Wykorzystując wyniki modelowania molekularnego przeprowadzono modyfikację lipazy A *Candida antarctica* metodą mutagenезy ukierunkowanej do miejsca (zestaw QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit). Otrzymano warianty F149D i F222S charakteryzujące się odmiennymi właściwościami katalitycznymi i zwiększoną selektywnością względem izomerów *trans* w porównaniu z lipazą natywną.

Uzyskane warianty lipazy A *Candida antarctica* zbadano pod kątem zdolności do hydrolizy substratów zawierających izomery trans- i cis- kwasów tłuszczowych. Określono preferencje substratowe względem estrów p-NP kwasu trans-elaidynowego (Ae) i kwasu trans-wakcenenowego (Aw) w stosunku do aktywności względem kwasu cis-oleinowego (Ao). Przeprowadzone pomiary potwierdziły większą preferencję w kierunku hydrolizy estrów p-NP kwasu wakcenenowego (C18:1  $\Delta$ 11 *trans*) i kwasu elaidynowego (C18:1  $\Delta$ 9 *trans*). Najkorzystniejszy stosunek Ae/Ao i Aw/Ao uzyskano po ekspresji zmodyfikowanych lipaz w komórkach *E. coli* Tuner (DE3)pLacI w temperaturze 30°C i wyniósł on odpowiednio 3,17 i 4,41 (lipaza F149D) oraz 2,15 i 3,14 (lipaza F222S). Zmodyfikowane lipazy cechowały się około 3-krotnym (wariant F149D) i 2-krotnym (wariant F222S) wzrostem preferencji substratowej w kierunku *trans* kwasów tłuszczowych w porównaniu z lipazą natywną.

Opracowane metody modelowania molekularnego oraz mutagenезy punktowej umożliwiły otrzymanie wariantów lipazy A o zmienionych właściwościach katalitycznych i zwiększonej selektywności wobec izomerów *trans*. Zmodyfikowane lipazy cechowały się

około 3-krotnym wzrostem preferencji substratowej w kierunku ich hydrolizy w porównaniu z lipazą natywną, co Doktorantka potwierdziła w reakcji hydrolizy oleju rzepakowego zawierającego 60% izomerów trans.

Pragnę podkreślić, że w tej nowatorskiej pracy wykorzystano nowoczesne techniki i także sprzęt badawczy, bez którego wykonanie badań nie byłoby możliwe. Wydaje się iż słuszne byłoby zamieszczenie w pracy spisu tych narzędzi oraz spisu stosowanych reagentów. Dostrzegam znaczący i ciekawy potencjał rozwojowy oraz naukową wartość zaplanowanych badań, które oceniam jako bardzo wartościowe.

Praca Doktorska Pani mgr Dągmary Głód wskazuje, że jest Ona dojrzałą, upartą, docieklwą, pracowitą i skuteczną w działaniu młodą badaczką. Zakres doświadczeń i sposób ich przeprowadzenia oraz opis i interpretacja wyników wskazują na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne, kreatywność i twórcze myślenie Autorki. Pracę tę czytałem z przyjemnością. Autorka w sposób klarowny prezentuje swoje poglądy oraz ze znanstwem dyskutuje z osiągnięciami innych uczonych. Praca ta przekracza ramy tzw. „przeciętnych doktoratów”.

Uważam, że recenzowana praca, w zakresie nowoczesnej biotechnologii, jest wartością dodaną do skarbnicy wiedzy oraz jednocześnie wskazuje możliwości praktycznych zastosowań różnych narzędzi do modyfikacji lipaz w celu otrzymania aktywnych i selektywnych biokatalizatorów. Praca ta jest przykładem doskonałej roboty naukowej łączącej w sobie zarówno pierwiastek poznawczy, jak i możliwość praktycznego zastosowania, co biorąc pod uwagę środowiska: uczelniane oraz przemysłowe, jest niezwykle ważne i potrzebne.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Dągmary Głód pt. „Ocena przydatności ukierunkowanej ewolucji molekularnej i racjonalnego projektowania białka enzymatycznego w doskonaleniu właściwości lipazy A z *Candida antarctica*” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane pracom doktorskim. Wnoszę, zatem o dopuszczenie Autorki przez Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy przez Radę Wydziału.

Tadeusz Antczak