

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Dagmary Głód
pt. „Ocena przydatności ukierunkowanej ewolucji molekularnej i racjonalnego
projektowania białka enzymatycznego w doskonaleniu właściwości lipazy A z *Candida*
***antarctica*”**

Oceniana praca doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Bednarskiego. Opracowanie obejmuje 132 strony maszynopisu. Rozprawa ma typowy układ dla prac o charakterze doświadczalnym i zawiera komplet wymaganych rozdziałów. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie tabelarycznej i graficznej. W maszynopisie rozprawy zamieszczono 24 tabele, 42 rysunki oraz 9 załączników ze szczegółowymi wynikami badan.

Problematyka rozprawy jest związana z doskonaleniem właściwości katalitycznych lipaz, a szczególnie z możliwością ich wykorzystania do produkcji tłuszczów jadalnych pozbawionych izomerów trans nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład triacylogliceroli. W zależności od typu wiązania odmienna jest konformacja przestrzenna cząsteczki kwasu tłuszczowego. W formie *trans* zachowują kształt liniowy, natomiast w formie *cis* mają charakterystyczne wygięcie w kształcie litery V. Konformacja przestrzenna tych kwasów odgrywa zasadniczą rolę w ich metabolizmie w organizmie człowieka. W tłuszczach naturalnych, jak przykładowo w maśle, zawartość form *trans* jest bardzo mała, natomiast w produktach uwodornianych przemysłowo ilość tych form jest znacznie większa. W ostatnich latach pojawiło się w piśmiennictwie naukowym szereg informacji o szkodliwym działaniu kwasów tłuszczowych występujących w formie *trans*. Wielu autorów wskazuje na ich działanie rakotwórcze i zwiększenie ryzyka wystąpienia chorób miażdżycowych. Z tego powodu w niektórych krajach wprowadzono zakaz sprzedaży produktów o zwiększonej zawartości tłuszczów *trans* (Dania, Kanada). W Polsce ilość spożywanych tłuszczów w formie *trans* 2-3-krotnie przewyższa ustalone normy. Ta sytuacja spowodowała gwałtowny wzrost badań poświęconych tej tematyce, w tym poszukiwanie technologii produkcji tłuszczu spożywczego nie zawierającego kwasów tłuszczowych w formie *trans*. Jednym z

obiecujących rozwiązań jest produkcja tłuszczu przy wykorzystaniu katalizy enzymatycznej i użyciu lipaz o odpowiedniej selektywności w stosunku do kwasów tłuszczowych.

W ostatnich latach pojawiły się nowe możliwości biotechnologiczne w biosyntezie lipaz o wysokie enancjoselektywności. Poprawę właściwości katalitycznych lipaz można osiągnąć stosując molekularne metody inżynierii białek, a mianowicie ukierunkowaną ewolucję, racjonalne projektowanie białka oraz projektowanie białek *de novo*. Dzięki tym metodom możliwe jest kształtowanie centrum aktywnego i jego otoczenia w białku enzymatycznym, a nawet tworzenie, nowych, sztucznych białek o określonych właściwościach katalitycznych. Zagadnieniu temu jest poświęcona rozprawa doktorska mgr Dagmary Głód. Autorka zainteresowała się właściwościami katalitycznymi lipazy A syntetyzowanej przez drożdże *Candida antarctica*. Enzym ten, z uwagi na liniowo skonstruowany tunel acylowy umożliwia selektywną reakcję z formą *trans* kwasów tłuszczowych i ich odczepianie od triacylogliceroli. W ten sposób można usuwać z tłuszczu niepożądane formy *trans* i podnieść ich wartość i bezpieczeństwo żywieniowe.

W części teoretycznej Autorka przedstawiła przegląd stanu wiedzy na temat budowy i właściwości katalitycznych lipaz oraz szeroko omówiła metody doskonalenia właściwości katalitycznych tych enzymów przez stosowanie metod molekularnych.

W materiale dotyczącym opisu właściwości lipaz Autorka wspomina kilkakrotnie o enancjoselektywności tych enzymów, jednak nigdzie nie znalazłem kluczowej informacji, w jaki sposób można wykorzystać tę cechę enzymu do produkcji bezpiecznych tłuszczu spożywczych pozbawionych kwasów tłuszczowych w formie *trans*, a przecież to wyjaśnienie jest niezbędne dla uzasadnienia badań podjętych przez Doktorantkę.

Podstawowa część przeglądu literaturowego jest poświęcona metodom doskonalenia właściwości katalitycznych enzymów przy pomocy ewolucji ukierunkowanej i racjonalnego projektowania takich białek. Zagadnienia te są przedmiotem czterech podrozdziałów, a więc mogę stwierdzić, że poświęcono im odpowiednio dużo uwagi. Materiał ten jest wartościowy, opisy są obszerne, pełne szczegółów i oparte na cytowaniu bogatego piśmiennictwa naukowego obejmującego 155 pozycji literaturowych. Jeśli chodzi o uwagi krytyczne to myślę, że można dyskutować na temat stosowanej nomenklatury. Przykładowo, dyskusyjna jest polska nazwa dla terminu error-prone PCR w brzmieniu „błędny PCR”. Wydaje się, że lepszym tłumaczeniem tego terminu jest „PCR podatny na błędy”, choć w piśmiennictwie polskim spotkałem wiele innych terminów na tę reakcję. Kolejnym dyskusyjnym terminem jest site-directed mutagenesis – mutageneza specyficzna co do miejsca lub mutacja ukierunkowana miejscowo-specyficzna, zamiast mutageneza ukierunkowana do miejsca.

Na str. 20 4 linia od dołu: Autorka pisze, że skринing wymaga organizacji testowanych wariantów na płytkach Petriego, podczas gdy w rzeczywistości metody skринingowej oparte są przede wszystkim na testach biochemicznych (oznaczanie aktywności enzymów, oznaczanie stref rozjaśnień, itp.).

Str. 21 7 linia od góry (l. 7 g.): - skринing zaawansowanych cykli – chyba chodzi o kolejne rundy mutagenезy. Str. 21, l 19 g: „, przy użyciu tasowania genów – powinno być przy użyciu metody rekombinacji.

Na str. 27, l. 13 d: Autorka pisze: „W celu oszacowania odległości mutacji od miejsca aktywnego stosowane są...”. Powinno być podkreślone, że chodzi o zobrazowanie położenia mutacji w trójwymiarowej strukturze białka (3D) w odniesieniu do centrum aktywności enzymu. Na tej samej stronie, niżej, l. 3 d: „Oszacowano, że każda zmiana w sekwencji aminokwasowej inaktywuje średnio 30-40% aktywnych białek”. To nie do końca jest ścisłe, W cytowanej publikacji autorzy wyznaczyli współczynnik x-factor, który określa prawdopodobieństwo wystąpienia efektu letalnego wskutek losowej zmiany aminokwasu w strukturze białka.

Na str. 28 l. 7 d.: pojawił się termin „mutagenезy nasycenia”. Co to oznacza?

Str. 30 Rys. 1. Racjonalne projektowanie – ostatni zapis powinien brzmieć: „Test enzymatyczny”. Ukierunkowana ewolucja molekularna – zamiast „metody nierekombinacyjne” powinno być „Metody losowe”.

Str. 32 l. 6 d: Termin „stronniczość” - tutaj chodzi o tendencję do faworyzowania określonego typu substytucji. Polimeraza Mutazyme faworyzuje substytucje GC na AT i GC na TA, stąd trudno to nazwać tworzeniem bibliotek „bezstronniczych”.

Str. 33 – ostatni akapit od dołu jest mało zrozumiały.

Na str. 34 potrzebne jest wyjaśnienie, co to jest rekombinacja homologiczna i niehomologiczna.

Na str. 35 – trzeci akapit od dołu: Coco i in..... Błędnie wyjaśniono technikę RACHITI – w tym przypadku chodzi o losową hybrydyzację fragmentów genów i syntezę chimerycznego genu na tymczasowej matrycy.

Mimo tych drobnych nieścisłości przegląd literaturowy uważam za wartościowy, bogaty w istotne informacje na temat molekularnej modyfikacji białek enzymatycznych i dobrze wprowadzający czytelnika w zagadnienia związane z częścią doświadczalną rozprawy.

W celu pracy Autorka wymienia pięć zadań szczegółowych, które mają doprowadzić do celu głównego, którym jest doskonalenie właściwości katalitycznych lipazy A z *Candida antarctica*, a mianowicie:

- opracowanie i optymalizacja etapów tworzenia bibliotek rekombinantów,
- selekcja i skryning uzyskanych mutantów o zwiększonej aktywności lipolitycznej względem izomerów cis/trans dienów kwasu linolowego,
- opracowanie metod bio-informatycznych w modelowaniu właściwości enzymów,
- charakterystyka molekularna wybranych genów,
- praktyczna weryfikacja przydatności zmodyfikowanych enzymów w katalizie wybranych reakcji chemicznych.

Wymieniona struktura eksperymentalna pracy stanowi logiczną całość. Jak to wynika z tytułu rozprawy i z wymienionych celów pracy do doskonalenia właściwości katalitycznych lipazy A zastosowano dwie metody: ukierunkowaną ewolucję oraz racjonalne projektowanie białka. Pierwsza z metod, oparta na losowej mutacji wywołanej zastosowaniem metody error-prone PCR do kopiowania genu, prowadzi do uzyskania puli zmodyfikowanych białek, z których wyłaniane są następnie najlepsze, najbardziej aktywne warianty tego enzymu.

W drugiej metodzie wychodzi się ze struktury natywnego białka, która musi być znana i musi pozwolić na analizę molekularną w przestrzeni trójwymiarowej (3D). Następnie *in silico* przeprowadza się modelowanie mutacji w obrębie określonego miejsca w strukturze białka, najlepiej w okolicach centrum aktywnego cząsteczki, tak, aby osiągnąć określony efekt funkcjonalny. Wykorzystuje się w tym celu odpowiednie narzędzia bioinformatyczne i bazy danych. Następnie przeprowadza się wybrane zmiany w sekwencji DNA w genie kodującym enzym i gen ten klonuje w odpowiednim systemie ekspresyjnym tak, aby wyprodukować oczekiwany, zmodyfikowany enzym.

Obie zastosowane metody modyfikacji molekularnej enzymu lipazy A są niezależne, choć prowadzą do tego samego celu, to jest do zwiększenia enancjoselektywności enzymu. Nasuwa się jednak pytanie, czy w jednej pracy konieczne było zastosowanie obu tych metod modyfikacji enzymu. Metoda mutacji losowej typu error-prone PCR jest uznana za metodę efektywną, pozwalającą na szybkie uzyskanie bardzo dużej ilości mutantów. Wymaga jednak zastosowania efektywnych, zautomatyzowanych metod skryningowych. Z opisów metod badawczych zastosowanych przez mgr D. Głód wynika, że nie dysponowała ona zautomatyzowaną aparaturą skryningową, co miało wpływ na ilość przebadanych mutantów. Dodatkowe badania dotyczące racjonalnej inżynierii białek z zastosowaniem technik *in silico*, ograniczyło zakres przebadanych mutantów, choć badania te zasługują na najwyższe uznanie w sensie warsztatowym. Bez wątplenia Doktorantka opanowała najważniejsze współczesne narzędzia eksperymentalne potrzebne do doskonalenia właściwości katalitycznych enzymów i

stała się w tym zakresie specjalistką. To jest jej bardzo silny atut i zastosowany warsztat eksperymentalny podnosi poziom naukowy tej rozprawy.

Jeśli chodzi o opisy poszczególnych etapów prac eksperymentalnych to są one bardzo rozbudowane i dokładne. Autorka przedstawia szczegółowo stosowane materiały oraz protokoły wykonawcze poszczególnych testów, oznaczeń i badań molekularnych. Niezależnie od pozytywnej oceny tej części pracy zwracam Autorce uwagę na pewne nieścisłości i niedopowiedzenia. I tak, w punkcie 4.3.3 brak jest informacji w jakiej bazie danych jest podana sekwencja genu dla lipazy A. Mam też kilka sugestii odnośnie użytych zapisów.

Rys. 4 - etap transformacji – zamiast „spod promotora faga...”, lepiej pod kontrolą promotora faga. Nieco niżej przy optymalizacji warunków hodowli należy dodać: sposób indukcji białka i momentu ekspresji genu.

Na str. 52 ostatni akapit tekstu – należy wyraźnie stwierdzić, że wykonano test α -komplementacji genu.

Str. 55, Tab. 9. – zamiast „właściwa denaturacja matrycy”, powinno być „denaturacja matrycy”.

Str. 56, pierwszy akapit – metodą dyfuzyjno-krażkową. Czy wykonano próbę ślepą z „pustym” plazmidem?

Str. 56 punkt 4.9. - należy wyraźnie napisać, że supernatantem jest surowy ekstrakt po dezintegracji komórek. To samo w punkcie 4.9.2. - jak się czyta trzeci akapit od góry, to odnosi się wrażenie, że aktywność enzymu była oznaczana w płynie hodowlanym, a przecież enzym nie był wydzielany do pożywki.

Str. 58 – dziwny układ osi (odwrotny) na rys. 6.

Str. 63 – w punkcie 4.13 - brakuje wstępu wyjaśniającego, co robiono? i w jakim celu?

W części wynikowej rozprawy mgr D. Głód połączyła w jeden rozdział Omówienie wyników i dyskusja. Omówienie wyników jest bardzo szerokie i dotyczy wszystkich istotnych elementów przeprowadzonych badań. Na podstawie amplifikacji genu lipazy A metodą PCR, a następnie jego klonowania i selekcji uzyskano 8 transformantów, z których jeden zawierał cały prawidłowy gen dla lipazy A. Dał on podstawę dla przeprowadzenia mutacji losowych metodą error-prone PCR. W ten sposób pozyskano zmodyfikowane geny, które następnie zostały sklonowane w *E. coli* i uzyskano w ten sposób bibliotekę transformantów do dalszych badań. Biblioteki te zostały poddane selekcji z użyciem antybiotyku i skринingowi z zastosowaniem metody dyfuzyjnej do wykrywania aktywności lipolitycznej wobec tributyriny i trioleiny. Transformanty odbarwiające podłoże choćby z jednym z

wymienionych lipidów były użyte do dalszego badania ich właściwości katalitycznych. Przeprowadzono testy wobec sprzężonego kwasu linolowego (TAG-CLA). Autorka scharakteryzowała selektywność kilku wybranych klonów i porównała je z charakterystyką komercyjnych preparatów lipolitycznych. To postępowanie oceniam jako prawidłowe i efektywne dla wyłonienia najciekawszych wariantów zmodyfikowanych lipaz. Wartościowa jest także dyskusja dotycząca oceny uzyskanych wyników na tle badań prowadzonych przez innych autorów. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że transformant Tuner(DE3)pLac1 w hodowlach wgłębnych ma zdolność do produkcji zarówno poza-, jak wewnątrzkomórkowych lipaz i że aktywność wewnątrzkomórkowa jest znacznie większa. Określono także aktywność lipolityczną otrzymanego mutantu MA39 w stosunku do estrów kwasu masłowego, palmitynowego, stearynowego i laurynowego. Wykazano, że przyjęte postępowanie skutecznie zmienia aktywność katalityczną enzymu w kolejnych rundach mutacji. Uzyskane wyniki szeroko przedyskutowano, jednak zabrakło mi komentarzy dotyczących praktycznego znaczenia uzyskanych wyników.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono wysokowydajny skrining wybranych mutantów wobec estrów *cis* i *trans* kwasów tłuszczowych i porównano aktywności enzymatyczne mutantów z lipazami komercyjnymi. Przeprowadzono także analizę zymogramu wewnątrzkomórkowej lipazy mutantu.

Druga część rozdziału omawiającego wyniki badań i dyskusji została poświęcona inżynierii białek przez zaprojektowanie i przeprowadzenie mutacji punktowych. Pierwszy etap tych prac stanowiło modelowanie molekularne. Autorka swe rozważania oparła na strukturze lipazy A z *Candida antarctica* opisanej przez Ericssona i in (2008). Wykorzystując odpowiednie programy komputerowe dokonała mutacji *in silico* reszt aminokwasowych znajdujących się w hydrofobowym tunelu CAL-A do którego powinien dopasować się liniowy łańcuch kwasu tłuszczowego. W pracy przedstawiono obrazowanie trzeciorzędowej struktury białka enzymatycznego w formie natywnej i w formach zmutowanych. Trudno jednak ocenić wyniki tych badań, gdyż sposób prezentacji wyników uniemożliwia dokładną analizę eksperymentu. Z informacji zawartych w pracy wynika, że głównym celem było zawężenie tunelu acylowego. Można się domyślać, że chodziło w tym przypadku o uformowanie tunelu do przyjęcia tylko liniowych form *trans* i wyeliminowanie możliwości wejścia w tunel wygiętych, a tym samym szerszych, form *cis*. To jednak w pracy nie zostało wyartykułowane, a przecież jest istotą planowanych mutacji.

Na stronie 86 Autorka podaje informacje, że jednym z podstawianych aminokwasów jest treonina, która jest wymieniana na resztę histydynową w celu zwężenia tunelu acylowego. To

co przedstawiono na rysunkach jest wizualizacją modyfikacji białka. Nie ma dodatkowej informacji o stopniu podobieństwa lub rozbieżności między sekwencjami aminokwasowymi natywnymi i zmodyfikowanymi. Autorka podaje, że triadę katalityczną stanowią seryna, kwas asparaginowy i histydyna. Do pokazania sposobu dokowania substratu użyto programu AutoDock. Brak mi jednak informacji jak ten program działa. Na uznanie zasługuje natomiast świetna ilustracja dokowania substratu przedstawiona na rys. 21 i 23. Dla pełnej czytelności tego rysunku powinno być wyjaśnione słownie znaczenie kodów aminokwasów. Uwaga ta dotyczy także innych rysunków, na których brak jest informacji na temat pokazywanych reszt aminokwasowych. Na stronie 88 w pierwszym akapicie od góry Autorka mówi „Wyniki dokowania wskazywały na obecność zderzeń pomiędzy ligandem (chyba chodzi o substrat – uwaga moja) a pozycją aminokwasową 149,...”. Moim zdaniem to są zawady steryczne. To samo dotyczy rys. 25.

W kolejnej rundzie analizy *in silico* Doktorantka wprowadziła dwie mutacje polegające na substytucji w odpowiednich pozycjach kwasu asparaginowego i waliny cysteiną oraz izoleucyny i treoniny cysteiną w celu wytworzenia mostka disiarczkowego, z podobnym zamiarem zwężenia wejścia do tunelu acylowego. Według informacji podanej przez mgr D. Głód, w wyniku tych zmian udało się osiągnąć zwężenie wejścia do tunelu. Zmiany te zilustrowano na rys. 26 i 27 oraz 28 i 29. Na rys. 30 brak mi wyraźnego wskazania miejsca centrum aktywnego.

Wysoko oceniam także badania związane z mutagenezą ukierunkowaną polegające na przeprowadzeniu mutacji punktowych (pkt 5.3.2.). Autorka dokonała pięciu mutacji punktowych przez substytucje nukleotydowe w DNA, co się przełożyło na zmianę aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym. Mutacje te potwierdzono na drodze sekwencjonowania DNA. Uzyskane mutanty zostały poddane procedurze skringowej z użyciem techniki rozjaśniania żelu zawierającego „mętny” substrat oraz skringing względem krótko-, średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a także skringing wobec izomerów *cis* i *trans* kwasów tłuszczowych. Pozwoliło to na charakterystykę właściwości katalitycznych uzyskanych mutantów. Wyniki tych badań zostały dobrze przedyskutowane.

Generalnie cały rozdział związany z modelowaniem molekularnym jest bardzo ciekawy i nowatorski, a przy tym dostarcza dużo informacji na temat konformacji i zmian konformacyjnych związanych z tunelem acylowym i dokowaniem do niego substratu. Badania te prezentują bardzo dobry poziom naukowy i stanowią jeden z najwartościowszych fragmentów tej pracy.

Dla porządku podaję także kilka drobnych błędów nomenklaturowych:

W wielu miejscach Autorka używa terminu elektroforogramy, zamiast elektroforegramy.

Str. 71 ostatni akapit – słowo transformowano zastąpić słowem subklonowano do komórek kompetentnych.

Str. 96 – „niutleniające środowisko” zastąpić „warunkami redukcyjnymi”

Część wynikową zamykają wnioski z badań. Moim zdaniem są one sformułowane dosyć ogólnikowo, choć oddają istotę przeprowadzonych badań.

Podsumowując moją ocenę stwierdzam, że praca reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, obejmuje duży zakres badań i zawiera elementy nowości naukowej. Autorka wykorzystwała nowoczesne metody badawcze, które pozwoliły na zwiększenie aktywności i enancjoselektywności badanego enzymu. Na szczególne uznanie zasługują badania związane z inżynierią białkową oraz z nowoczesną techniką mutacji w oparciu o error-prone PCR. Praca ma wybitnie biotechnologiczny charakter i duży potencjał aplikacyjny.

Wniosek końcowy:

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej, a także zakres wykonanych badań, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Dagmary Głód w pełni spełnia wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Z.U. z 2003, Nr 65, poz. 595, z póź. zm.) w zakresie wymagań na stopień doktorski i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy tej rozprawy i jej nowatorski charakter wnioskuję o jej wyróżnienie w trybie wybranym przez Radę Wydziału.


Prof. dr hab. Włodzimierz Grajek