

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
Centrum Badań Biokrytalograficznych  
Zespół Struktury i Funkcji Biomolekuł  
e-mail: [wojtekr@ibch.poznan.pl](mailto:wojtekr@ibch.poznan.pl)  
tel: 61-8528503  
fax: 61-8520532

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wojtkowiak  
pt. „Badania krystalograficzne 1,3- $\beta$ -glukanazy z *Solanum tuberosum*”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Krystalografii Wydziału Chemii UAM a także w Centrum Badań Biokrytalograficznych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem promotorskim prof. Mariusza Jaskólskiego. Rozprawa dotyczy badań strukturalnych 1,3- $\beta$ -glukanazy z ziemniaka. Enzym ten hydrolizuje polimery D-glukozy połączonej wiązaniem glikozydowym  $\beta$ -1,3. Ten rodzaj glukanów jest znany jako element ściany komórkowej grzybów, występuje on także w bakteriach i jako składnik błonnika w roślinach. Jako substancja obca w zwierzętach może wywoływać odpowiedź immunologiczną i bywa przyczyną alergii. Jest też wykorzystywana do pobudzania systemu odpornościowego. Enzymy o aktywności 1,3- $\beta$ -glukanazy podzielono dotychczas na sześć rodzin wg typu pożądanego i mechanizmu reakcji. Roślinne 1,3- $\beta$ -glukanazy zaklasyfikowano do rodziny glikozydaz 17 (GH17). Wcześniej poznano struktury trzech enzymów tego typu: z jęczmienia, bananowca i kauczukowca.

*Cel badań* został podany na samym początku rozprawy jako, po pierwsze, określenie struktury przestrzennej metodami krystalograficznymi 1,3- $\beta$ -glukanazy z ziemniaka. Drugim celem doktorantki była identyfikacja i charakterystyka miejsc wiążących substrat w tym białku. Miały to wyjaśnić badania krystalograficzne kompleksów oligosacharydów ze zmutowaną formą enzymu, w którym resztę aminokwasową, będącą nukleofilem reakcji enzymatycznej zamieniono na alaninę. Wcześniej nie określono, jak enzymy w tej rodzinie oddziałują z sacharydami. Stwierdzam, że cele zostały jasno zdefiniowane w rozprawie, a problem, jaki doktorantka podjęła się rozwiązać, jest oryginalny, interesujący z poznawczego punktu widzenia i dotyczy istotnych niewyjaśnionych dotąd zagadnień. Zatem teza naukowa postawiona przez doktorantkę z całą pewnością jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

*Układ i edycja rozprawy.* Rozprawa liczy 122 strony wraz z bibliografią. Tekst jest podzielony na rozdziały w sposób tradycyjny. Po części literaturowej przedstawiona jest metodyka badań, część doświadczalna i dyskusja wyników. Tekst kończą podsumowania w językach polskim i angielskim. Rozprawa napisana jest przystępnie i widać, że autorka przykładła wagę do poprawności językowej, unikając typowych błędów. Tekst jest starannie ilustrowany i uzupełniony bibliografią. Stwierdzam, że doktorantka wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

*Część literaturowa.* Wstęp jest treściwym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Po kolei omawiana jest specyfika węglowodanów i enzymów, które je hydrolizują. Jest to bardzo

obszerna rodzina białek, dlatego potraktowanie ich bardzo skrótowo jest zrozumiałe a nawet konieczne. Niemniej nakreślone są zasady klasyfikacji i rozróżnione dwa główne mechanizmy działania – z retencją bądź inwersją konfiguracji na anomerycznym atomie węgla. Doktorantka poświęca więcej miejsca 1,3- $\beta$ -glukanazom i dotychczasowym badaniom ich struktury. Na koniec opisuje zastany stan wiedzy o obiekcie jej zainteresowań, tzn. 1,3- $\beta$ -glukanazie z ziemniaka. Bibliografia liczy 165 odnośników literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktorantki w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Mam tu jedną uwagę: we wstępie doktorantka pisze, że (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukany wytwarzane są m.in. przez niektóre bezkręgowce, a w kolejnym paragrafie pisze, że nie występują naturalnie w organizmach zwierzęcych. Proszę o wyjaśnienie.

*Metodyka badań* jest opisana krótko, ale treściwie i z dbałością o poprawność językową. Tekst nawiązuje do standardowych pozycji literaturowych. Nadmienię tu tylko, że nie udokładniamy struktury, tylko model struktury. Struktura jest, jaka jest. To samo dotyczy oceny jakości. Oceniamy model, nie strukturę. Stwierdzam, że opis prac laboratoryjnych jest dostatecznie dokładny, aby wyniki eksperymentalne doktorantki uznać za wiarygodne.

Przechodzę do omówienia wyników badań mgr Agnieszki Wojtkowiak. Materiał do badań, czyli oczyszczone białko, zostało dostarczone z innej placówki naukowej, więc praca doktorantki zaczęła się od krystalizacji i później też jest prawie wyłącznie krystalograficzna. Doktorantka otrzymała dwie formy krystaliczne natywnej 1,3- $\beta$ -glukanazy różniące się nieco parametrami komórki elementarnej przy identycznej grupie przestrzennej. Bardziej szczegółowe badania struktury potwierdziły później, że rzeczywiście są to różne formy krystaliczne. Zanim przejdę dalej mam pytanie o warunki krystalizacji. Składnikami roztworu użytego do krystalizacji były 0,1 M octan sodu i 0,2 M octan amonu. Odczyn pH roztworu wynosił nominalnie 4,6. Octan amonu jest dość często wykorzystywany w biologii jako bufor, chociaż oba jego komponenty mogą stać się substancjami lotnymi. To rodzi pytanie o stabilność pH w czasie. Czy rzeczywiście jest to dobry bufor, a jeżeli tak, to w jakich warunkach?

W obu formach krystalicznych część asymetryczna zawierała po dwie monomeryczne cząsteczki 1,3- $\beta$ -glukanazy. Znacznik histydynowy umieszczony na C-końcu łańcucha polipeptydowego jednej cząsteczki oddziałuje z wnęką katalityczną drugiej cząsteczki białka. W przypadku formy krystalicznej oznaczonej jako LD (od *low density*, bo tam upakowanie cząsteczek w sieci jest nieco luźniejsze niż w formie oznaczonej HD) widać gęstość elektronową całego znacznika, a strukturze HD widać tylko końcową resztę histydyny. To kolejny przykład na to, co nie raz obserwowałem wcześniej, że wnęki katalityczne enzymów często wykazują nadzwyczajną zdolność wiązania ligandów, jeżeli nie swoistych, to innych obecnych w roztworze. Porównanie otrzymanych struktur enzymu w formie natywnej z innymi enzymami z tej samej rodziny pozwoliło doktorantce zaobserwować mobilność i różnice w strukturze subdomeny znajdującej się na zewnętrznej części cylindra ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, co może wskazywać na różnice w wiązaniu substratu między różnymi enzymami z rodziny GH17.

Kolejnym obiektem badań był mutant E259A 1,3- $\beta$ -glukanazy zaprojektowany, aby znieść aktywność enzymu i umożliwić utworzenie stabilnego kompleksu z substratem. Zmutowano resztę kwasu glutaminowego pełniącego rolę nukleofila w reakcji hydrolizy substratu.

Doktorantka wykrystalizowała, otrzymując nową formę krystaliczną, samego mutantu, a następnie wykrystalizowała i zbadała struktury dwóch innych kryształów kompleksu zmutowanego białka z heksasacharydami dodanymi w różnych proporcjach w stosunku do białka. Te ostatnie też wykrystalizowały w innej formie krystalicznej względem poprzednich. W sumie doktorantka otrzymała cztery formy krystaliczne, chociaż wszystkie, zbiegiem okoliczności, należały do tej samej grupy przestrzennej – P2<sub>1</sub>.

Po rozwiązaniu struktury białka krystalizowanego w obecności heksasacharydowego substratu doktorantka odkryła, że w bruzdzie wiążącej substrat, w pozycjach oznaczonych -1, -2 i -3 znajduje się trisacharyd. Dodatkowo, przy wyższym początkowym stężeniu heksasacharydu, pojawia się wyraźna gęstość elektronowa dla pierścieni cukrowych w pozycjach +3 i +4 oraz nieuporządkowana gęstość w pozycjach +1 i +2. Ewidentnie zaszła reakcja hydrolizy substratu i we wnęce katalitycznej związały się produkty reakcji. Doktorantka potwierdziła to spektrometrią mas na próbkach substratu inkubowanych ze zmutowanym enzymem. Okazało się więc, że mutant E259A nie jest całkiem nieaktywny. Być może dlatego, że, jak doktorantka zauważyła, w miejscu gdzie w natywnym białku znajduje się Oε z grupy karboksylowej katalitycznej reszty glutaminowego ulokowała się cząsteczka wody. Prawdopodobnie funkcjonuje ona jako swoista proteza reszty katalitycznej. Czy można zatem zaproponować jakąś skuteczniej dezaktywującą mutację niż do alaniny?

W rezultacie analizy kryształów otrzymanych w obecności oligosacharydów doktorantka szczegółowo opisała oddziaływania zmutowanego enzymu z produktami reakcji katalitycznej. Jest to pierwsza charakterystyka oddziaływań enzymu z rodziny GH17 z sacharydami.

Chciałbym jeszcze zapytać, czy w świetle poznanej struktury 1,3-β-glukanazy można wytłumaczyć maksymalną aktywność tego enzymu w zakresie pH 5,4-5,8?

Wyniki badań wchodzące w skład niniejszej rozprawy zostały opublikowane w dwóch pracach w Acta Crystallographica D – Biological Crystallography. Jest to dobre, klasyczne czasopismo międzynarodowe publikujące badania w obszarze biokrytalografii. Jego współczynnik wpływu (*Impact Factor*) ostatnio osiągnął 12,62. Doktorantka jest wiodącym autorem obu publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że niniejszą rozprawę oceniam wysoko. Doktorantka bardzo dobrze sprostала wyzwaniom. Mgr Agnieszka Wojtkowiak dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze krytalografii. Rozwiązała postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwej do danego zadania metody. Wykazała się dużą konsekwencją w dążeniu do naukowego celu i umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu. Z uwagi na sukces publikacyjny wnoszę też o wyróżnienie doktoratu.

Wojciech Rypkiewicz

Poznań, 10 maja 2013 roku