



Wrocław 25.11.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Magoch
„MikroAnaliza strukturalna czynników wirulencji *Streptococcus*
pneumoniae (EIIA) oraz *Staphylococcus aureus* (ScpA2)”

Infekcje bakteryjne są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Szacuje się, że ponad 1,3 miliona ludzi umiera rocznie z powodów chorób bezpośrednio wywołanych przez antybiotykooporne bakterie. Przy braku działań zapobiegawczych, może to doprowadzić nawet do 10 mln zgonów w 2050 roku. Wśród sześciu najbardziej zjadliwych antybiotykoopornych patogenów odpowiedzialnych za ponad 900 000 śmierci rocznie są szczepy *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus pneumoniae* jest najczęstszą przyczyną bakteryjnego zapalenia płuc będącego powikłaniem po infekcji covid-19. Stwierdzono, że w połowie przypadków szczepy powodujące infekcje są odporne na powszechnie używany antybiotyk – azytromycynę. Infekcje wywołane zjadliwymi bakteriami są również poważnym problemem dla hodowców zwierząt. Niestety, ilość nowych leków, które można użyć wobec antybiotykoopornych szczepów jest mocno ograniczona. W poprzedniej dekadzie tylko 10 nowych antybiotyków zostało wprowadzonych na rynek amerykański. Jest wiele powodów, które ograniczają prace nad nowymi lekami przeciwbakteryjnymi. Jednym z nich jest brak dostępnych struktur przestrzennych białek bakteryjnych, które mogłyby zostać użyte do projektowania nowych terapeutyków.

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Małgorzata Magoch przedstawiła struktury krystaliczne dwóch białek będących czynnikami wirulencji *Streptococcus pneumoniae* (białko EIIA) oraz *Staphylococcus aureus* (białko ScpA2). Białka te mogą być celem molekularnym dla nowych terapii antybiotykowych skierowanych przeciw tym patogenom.

Praca doktorska została zrealizowana pod opieką merytoryczną prof. dr hab. Grzegorza Dubina, który posiada znaczący dorobek badawczy w obszarze biologii strukturalnej.

Podstawą rozprawy doktorskiej są dwa opublikowane artykuły naukowe. Praca jest bardzo zwięzła i liczy zaledwie 52 strony. Dysertacja rozpoczyna się od streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Każdy z artykułów poprzedzony jest wstępem wprowadzającym czytelnika do zagadnień opisanych w danej pracy oraz krótkim streszczeniem. Następnie doktorantka zamieściła rozdział, w którym znalazło się streszczenie wyników oraz dyskusja. Pracę zamyka rozdział Literatura, w którym zawarte zostało 61 pozycji. Obydwa artykuły będące postawą pracy zostały zamieszczone w czasopiśmie *Molecules* [IF = 4.927; pkt. MEiN = 140]. Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami Pani Małgorzata Magoch odpowiada w 69% za powstanie publikacji zamieszczonej w czasopiśmie *Molecules* 2020 oraz w 50% za powstanie artykułu w *Molecules* 2023.

Rozdziały 4.1.1 oraz 5.1.1 (Wstęp) poprzedzające publikacje zostały napisane dobrze. Doktorantka w należyty sposób wprowadza czytelnika do zagadnień związanych z problemem patogenów *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus pneumoniae*. Informacje o aktywności biochemicznej analizowanych białek są poprawne. Wstęp do artykułów jest krótki, ale treściwy, niedosyt budzi brak omówienia metod badawczych użytych w pracy.

W rozdziale „*Streszczenie wyników przedstawionych w pracy wraz z dyskusją*” doktorantka pokrótce opisała wyniki prowadzonych przez siebie badań. Mgr Małgorzata Magoch otrzymała dwie dobrej jakości struktury przestrzenne białek EIIA z *Streptococcus pneumoniae* oraz ScpA2 z *Staphylococcus aureus*. Obydwe struktury krystaliczne są nowe, nie były zaprezentowane w literaturze ani zdeponowane w banku danych PDB.

Rozwiązanie struktury przestrzennej białka EIIA-Man z *S. pneumoniae* pozwoliło doktorantce na opisanie strukturalnych aspektów mechanizmu katalizy, podstaw oddziaływania z innymi białkami transportu mannozy oraz zaproponowanie sekwencji zdarzeń zachodzących w trakcie translokacji cukrów. Opis reszt oraz elementów strukturalnych białka EIIA jest wnikliwy, autorka rozprawy bardzo dobrze odnosi się do dostępnych danych literaturowych dla podobnych białek i logicznie wnioskuje o zdarzeniach molekularnych w białku EIIA-Man z *S. pneumoniae*. Ponadto, opisana w pracy molekularna architektura kieszeni katalitycznej białka,

zawierająca kluczową resztę His10, pozwala na racjonalne zaprojektowanie niskocząsteczkowych inhibitorów, które mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne.

Drugim białkiem, dla którego doktorantka otrzymała wartościowe dane strukturalne jest czynnik wirulencji - białko ScpA2 (*Stafopaina C*) z *Staphylococcus aureus*. Białko to jest wydzielane przez szczep bakterii infekujący ptaki. Analiza strukturalna wykonana przez mgr Magoch wykazała, że białko posiada budowę charakterystyczną dla rodziny papain, a elementy triady katalitycznej są rozmieszczone w domenach L i R podobnie jak w białkach homologicznych. Doktorantka, porównując swoją strukturę do cząsteczek opisanych w literaturze, przeprowadziła bardzo wnikliwą analizę reszt zaangażowanych w reakcje katalizy oraz miejsca wiązania substratu w tym kluczowej dla specyficzności kieszeni S2. Ponadto, co warte podkreślenia, struktura białka rozwiązana przez mgr Magoch jest aktywną formą apoenzymu. Struktura ScpA2 pochodząca z patogennego szczepu *Staphylococcus aureus* może posłużyć do zaprojektowania specyficznych inhibitorów, o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu drobiu.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag oraz pytań:

Struktura przestrzenna EIIA -Man z *S. pneumoniae* została rozwiązana z rozdzielczością 1.8Å, a *Stafopaina C* z rozdzielczością 1.58Å, co w pracy jest określane jako „na poziomie atomowym”. Określenie to raczej stosuje się dla struktur o rozdzielczości poniżej 1,2Å.

Co oznacza, że „enzym EI, który jest jednym z najbardziej konserwatywnych białek bakteryjnych”.

W publikacji pojawia się zdanie: „*Relatively long crystallization time suggested possible processing of the initial construct.*” Proszę o komentarz.

Wśród niepolarnych reszt aminokwasowych wymienionych na stronie 43 znalazła się seryna.

Czy tworzenie kryształów białka ScpA2 w kształcie X było powtarzalne?

Proszę również o informacje, w które eksperymenty oraz analizy była bezpośrednio zaangażowana doktorantka.

Podsumowując, pragnę podkreślić wysoki poziom przedstawionej do oceny pracy. Mgr Małgorzata Magoch otrzymała dwie wartościowe struktury przestrzenne białek EIIA z *Streptococcus pneumoniae* oraz ScpA2 z *Staphylococcus aureus*, które mogą posłużyć do zaprojektowania niskocząsteczkowych środków terapeutycznych. Doktorantka przedstawiła rezultaty swoich badań w dwóch publikacjach, w których jest pierwszym autorem. Moja ocena

przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Analiza strukturalna czynników wirulencji *Streptococcus pneumoniae* (EIIA) oraz *Staphylococcus aureus* (ScpA2)” jest wysoka, a rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z późn. zmianami).

Wnoszę o dopuszczenie magister Małgorzatę Magoch przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Daniel Krowarsch