

Poznań, 25.11.2023 r.

dr hab. Krzysztof Brzeziński, prof. IBCH PAN  
Zakład Biologii Strukturalnej Organizmów Prokariotycznych  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
e-mail: kbrzezinski@ibch.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

**mgr Małgorzaty Magoch**

z tytułu

**„Analiza strukturalna czynników wirulencji *Streptococcus pneumoniae* (EIIA) oraz  
*Staphylococcus aureus* (ScpA2)”**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Magoch pt. „**Analiza strukturalna czynników wirulencji *Streptococcus pneumoniae* (EIIA) oraz *Staphylococcus aureus* (ScpA2)**” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Dubina, w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Obiektem zainteresowania naukowego Doktorantki są białka wywodzące się z patogennych mikroorganizmów, które mogą być istotnymi celami przyszłych terapii przeciwbakteryjnych u człowieka i zwierząt. Pierwszym badanym białkiem był komponent EIIA systemu fosfotransferazy mannozowej, będącej elementem kompleksu transportującego cukry u *Streptococcus pneumoniae*. Bakteria ta opiera swój metabolizm i pozyskiwanie energii w oparciu o proces glikolizy, a jej genom koduje liczne transportery zaangażowane w absorpcję i przemianę cukrów. Pozwala to na szybkie przestawienie metabolizmu bakterii w zależności od dostępności poszczególnych cukrów w środowisku zainfekowanego gospodarza. Drugim analizowanym białkiem była stafopaina C, proteaza cysteinowa ze *Staphylococcus aureus*, która jest specyficzna dla ptasich szczepów gronkowca złocistego. Enzym ten należy do licznej grupy zewnątrzkomórkowych proteaz, które warunkują wirulencję *S. aureus*. Z uwagi na powszechną antybiotykooporność, wybór nowych celów molekularnych, przykładowo enzymów istotnych dla metabolizmu patogennego organizmu oraz ustalenie ich struktury przestrzennej na poziomie atomowym jest istotne dla opracowania nowych związków o właściwościach przeciwbakteryjnych. Dlatego głównym celem Pani mgr Małgorzaty Magoch było określenie struktur krystalicznych czynników wirulencji *Streptococcus pneumoniae* (komponent EIIA) i *Staphylococcus aureus* (stafopaina C)



oraz ich analiza strukturalna. Doktorantka osiągnęła zamierzony cel w oparciu o badania strukturalne oparte na metodach biokrytalografii.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego zbioru publikacji zawierającego dwie prace eksperymentalne. Obie prace, które opublikowano w czasopiśmie *Molecules*, dotyczą badań strukturalnych białek wywodzących się z patogennych bakterii. Praca nr 1 z 2020 roku przedstawia strukturę krystaliczną białka EIIA, składowej systemu transportującego cukry u dwoinki zapalenia płuc, natomiast Praca nr 2 z 2023 dotyczy struktury krystalicznej stafopainy C, proteazy cysteinowej z gronkowca złocistego. W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorantka przedstawiła szczegółowy opis swoich badań z podziałem na dobrze wprowadzające w tematykę streszczenie, wstęp i podsumowanie każdej z publikacji oraz podsumowanie przedstawionych wyników. Opis oparto na 61 pozycjach literaturowych, opublikowanych w uznanych periodykach związanych między innymi z mikrobiologią oraz biologią strukturalną kompleksów białkowych transportujących cukry oraz proteaz pochodzenia bakteryjnego. Należy zwrócić uwagę, że część badań, która obejmuje analizę strukturalną proteazy cysteinowej z gronkowca złocistego została wykonana w ramach realizacji projektu z Narodowego Centrum Nauki związanego, którym kierował Promotor Doktorantki, prof. dr hab. Grzegorz Dubin. Rozprawa doktorska została opisana w sposób zwięzły i przejrzysty. Autorka nie ustrzegła się kilku drobnych błędów, głównie natury edytorskiej. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na powszechny błąd, mianowicie Doktorantka naprzemiennie używa sformułowań „struktura krystaliczna” lub „struktura krystalograficzna”. Prawidłowa jest pierwsza forma.

Na podstawie oświadczenia złożonego przez Doktorantkę oraz dostarczonych oświadczeń pozostałych współautorów obu publikacji zawartych w tej rozprawie widać, że wniosła ona znaczący wkład w powstanie obu publikacji. Według dostarczonych oświadczeń wyniósł on odpowiednio 69% (Praca nr 1) oraz 50% (Praca nr 2). W tym miejscu chciałbym jednak pozwolić sobie na drobny komentarz, dotyczący udziału poszczególnych współautorów w powstaniu Pracy nr 1. Mianowicie, przypisywanie udziału współautorów na poziomie 2%, czy też zbyt dokładne ustalanie udziału współautorstwa np. na poziomie 69% może wzbudzać pewne kontrowersje. Uważam, że w tym przypadku najistotniejszy jest fakt, że Doktorantka miała największy udział w powstaniu obu publikacji, na co również wskazali pozostali autorzy oraz to, że w obu pracach jest pierwszym autorem.

Obie publikacje przedstawiają struktury krystaliczne dwóch bakteryjnych czynników wirulencji. Zostały one zaprezentowane w typowy sposób dla tego typu prac, które przedstawiają analizę strukturalną makromolekuł w oparciu o metody krystalografii. Ich niewątpliwą zaletą jest opisanie szeregu problemów, które krystalografowie mogą napotkać w swoich badaniach, a których rozwiązanie nie zawsze jest oczywiste. W Publikacji nr 1 opisującej badania nad komponentem EIIA systemu fosfotransferazy mannozowej głównym problem dotyczył braku odpowiedniej jakości monokryształów



na potrzeby badań dyfrakcyjnych. Jest to powszechny problem, którego rozwiązanie wymaga zastosowanie różnych metod optymalizacji np. procesu wzrostu kryształów, których sukces jest przeważnie losowy. W przypadku komponentu EIIA zabiegiem pozwalającym na uzyskanie odpowiedniej jakości kryształów okazała się częściowa proteoliza komponentu *in situ*. Proces ten również wymagał szeregu optymalizacji. Publikacja nr 2 opisuje problematykę analizy danych uzyskanych w eksperymentach dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na zbliżonych kryształach. W takich przypadkach wstępna analiza danych dyfrakcyjnych wskazuje nieprawidłową, zawyżoną symetrię kryształu. Co prawda, na początkowych etapach udało się rozwiązać Doktorantce strukturę krystaliczną, jednakże nie mogła ona zostać udokładniona. Dopiero szczegółowa analiza danych krystalograficznych pozwoliła na określenie prawidłowej grupy przestrzennej kryształu oraz ponowne rozwiązanie i udokładnienie struktury krystalicznej stafopainy C. Na uwagę zasługuje fakt, że strukturę krystaliczną o rozdzielczości 1.58 Å udokładniono do bardzo niskich wartości (jak na taką rozdzielczość) wskaźników  $R_{work}$  (9.0%) i  $R_{free}$  (11.3%). Dlatego chciałbym zapytać Doktorantkę o sposób określenia granicy rozdzielczości zmierzonych danych dyfrakcyjnych, dla monokryształu stafopainy C. Według Publikacji nr 2, Tabela 2, stosunek sygnału do szumu, wskaźniki rozbieżności oraz parametr  $CC_{1/2}$  wyraźnie wskazują na wyższą rozdzielczość danych dyfrakcyjnych. Według jakich kryteriów rozdzielczość określono na poziomie 1.58 Å? Uważam, że rozdzielczość danych dyfrakcyjnych jest w tym przypadku znacznie wyższa. Jest to również jeden z powodów, dla czego struktura krystaliczna została udokładniona do bardzo niskich wskaźników  $R_{work}$  i  $R_{free}$ . Analogicznie, jak to określono dla danych dyfrakcyjnych opisanych w Publikacji nr 1?

Pomimo powyższych uwagi i pytań, podtrzymuję swoją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Magoch. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki, które niewątpliwie stanowią elementy nowości naukowej, zaliczam określenie struktury krystalicznej obu bakteryjnych czynników wirulencji. W trakcie realizacji badań nad komponentem EIIA Doktorantka napotkała szereg problemów, zwłaszcza na wstępnych etapach badań krystalograficznych, co początkowo uniemożliwiało uzyskanie monokryształów na potrzeby rentgenografii strukturalnej. Jednak determinacja oraz kompleksowe i systematyczne podejście doprowadziły Doktorantkę do otrzymania odpowiedniej jakości kryształów i, w konsekwencji, analizę strukturalną tego białka. Analogicznie, szczegółowa analiza danych eksperymentalnych, która wykazała inne upakowanie cząsteczek białka w sieci krystalicznej pozwoliła Doktorantce udokładnić strukturę krystaliczną stafopainy C. Radzenie sobie z wyżej wymienionymi problemami metod biokrystalografii dowodzą bardzo dobrego merytorycznego przygotowania mgr Małgorzaty Magoch do dalszej, niezależnej pracy naukowej.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Magoch przedstawia interesujące wyniki strukturalne. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy pracy, jej interdyscyplinarny zakres oraz sposób przedstawienia wyników świadczący o samodzielności Doktorantki w prowadzeniu badań naukowych, stwierdzam, że rozprawa spełnia kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595; z 2005 r. nr 164, poz. 1365, z 2010 r. nr 96, poz. 620, nr 182, poz. 1228, z 2011 r. nr 84, poz. 455). Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Magoch do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych dyscyplinie nauki biologiczne.

