

Dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG
Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR SOPHII BAŁDYSZ ZATYTUŁOWANEJ:

‘A NEW IDENTIFICATION METHOD OF PHAGE CELL WALL-ASSOCIATED LYTIC PROTEINS’

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Sophii Bałdysz została wykonana pod kierunkiem dr hab. Roberta Nawrota, prof. UAM w Zakładzie Wirusologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pomocniczym był dr hab. Jakub Barylski.

Pani Sophia Bałdysz jest autorką 8 publikacji w tym dwie, które ukazały się w 2024 r. dotyczą tematyki niniejszej pracy, jedna w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* „What do we need to move enzymatic bioinformatics forward?”, a druga w *Applied and environmental microbiology* „Tear down that wall-a critical evaluation of bioinformatic resources available for lysin researchers”. Prace nie mają jeszcze wielu cytowań. Jest to jednak zrozumiałe ze względu na krótki okres czasu od momentu ukazania się publikacji. W obu pracach Pani Sophia Bałdysz jest pierwszym, wiodącym autorem co zasługuje na pozytywne podkreślenie. Rozprawę doktorską Pani Sophii Bałdysz stanowi jednak praca pisemna, a nie zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Dorobek naukowy Pani Sophii Bałdysz potwierdza jednak nie tylko umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, ale także prezentacji wyników badań szerszemu gronu naukowców. Na uwagę zasługuje również kierowanie minigrantem doktoranckim 017/02SNP/0025 „Lizować czy nie lizować — przewidywanie aktywności endolizyn bakteriofagowych” finansowanym przez UAM, Inicjatywa Doskonałości — Uczelnia Badawcza w latach 2021-2022. **Czy Doktorantka mogłaby przedstawić w ramach jakich projektów badania do niniejszej pracy zostały wykonywane i przedstawić w skrócie swój dorobek naukowy? Czy Doktorantka przedstawiała wyniki badań na konferencjach naukowych?**

Praca Pani mgr Sophii Bałdysz napisana jest w języku angielskim zgodnie z wymogami Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Do rozprawy doktorskiej Doktorantka dołączyła również wymagane streszczenie w języku polskim. Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom eksperymentalnym, a praca napisana jest ciekawie, w przejrzysty sposób.

Ocena merytoryczna

Zgodnie z badaniami prowadzonymi przez Uniwersytet Oxfordzki i Instytut Pomiarów i Oceny Zdrowia (ang. the Institute for Health Metrics and Evaluation; IHME) afiliowany przy Wydziale Medycznym Uniwersytetu w Waszyngtonie, USA tylko w 2019 roku prawie 13,66 mln osób zmarło na

powikłania związane z infekcjami bakteryjnymi. Około 4.96 milionów przypadków związanych było z infekcjami wywołanymi przez wielolekooporne szczepy bakterii takie jak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* czy *Pseudomonas aeruginosa*. Powyższe, alarmujące dane, są bezpośrednią przyczyną poszukiwania alternatywnych metod zwalczania bakterii i leczenia wywoływanych przez nie zakażeń. Badania nad endolizynami pochodzenia bakteriofagowego dobrze wpisują się w aktualny trend.

Mgr Sophia Bałdysz w obszernym wstępie przybliżyła tematykę nie tylko endolizyn, które produkowane są przez bakteriofagi pod koniec cyklu litycznego w celu uwolnienia cząstek potomnych do środowiska, ale także związanych z bakteriofagami tzw. enzymów VALs (ang. virion-associated lysins). Enzymy te związane są z cząsteczkami bakteriofagów i umożliwiają wstrzyknięcie materiału genetycznego faga do środka komórki bakteryjnej. VALs zostały zidentyfikowane jako składowe płytki podstawowej bakteriofaga T4, w obrębie główki u bakteriofaga T7, czy jako składowa części lipidowej kapsydu bakteriofaga PRD1. Autorka pracy w niezwykle ciekawy sposób przedstawia aktualne dane dotyczące zastosowań praktycznych zarówno endolizyn jak i enzymów VALs. Zwraca chociażby uwagę na średnio wyższą termostabilność domen katalitycznych VALs w porównaniu do domen katalitycznych endolizyn. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być podwyższona ekspozycja enzymów VALs na, często niekorzystne, warunki środowiska. Dodatek zatem domen enzymów VALs do jednostek katalitycznych endolizyn mogłoby zwiększyć ich stabilność termiczną. Wstęp przekazuje czytelnikowi rzetelną wiedzę na temat zagadnienia badawczego, którym zajmowała się mgr Sophia Bałdysz. Wzbożony jest również szeregiem przykładów z najnowszej literatury, co pozwala stwierdzić, że Doktorantka w pełni zgłębiła badany temat.

W postaci tabeli przedstawiła najnowszy stan wiedzy odnośnie badań przedklinicznych i klinicznych dotyczących endolizyn. To co zaskakuje to przedwczesne zakończenie/przerwanie niektórych z rozpoczętych badań klinicznych. Endolizyny znane od 1950 roku zyskały popularność dopiero w początkach XXI wieku po zastosowaniu jako środek zwalczający *Streptococcus pyogenes* w mysim modelu infekcji bakteryjnej. Od tego czasu zaczęto stosować nazwę „enzybiotyki” a zastosowanie antybakteryjne endolizyn zyskiwało coraz większą popularność. Według doktorantki wpisanie hasła „lizyna” oraz identyfikatora taksonomicznego wirusów (taxonomy_id: 10239) w wyszukiwarce bazy NCBI Protein skutkowało oznaczeniem jako lizyny 13,483 sekwencji. Dzisiejszy etap badań nad endolizynami to nie tylko odkrywanie nowych enzymów, ale również ulepszanie tych już odkrytych. Naukowcy podnoszą jednak fakt „białkowego” charakteru lizyn co może przyczynić się do ich szybkiej degradacji przez szereg enzymów proteolitycznych. Napotkanym problemem w praktycznym użyciu endolizyn jest również często raportowany brak ich aktywności w obecności serum ludzkiego.

Na uwagę zasługuje fakt powstania baz danych, które specyficznie zawierają sekwencje enzybiotyków, czy enzymów litycznych. Dziwi jednak brak aktualizacji lub brak bieżącego dostępu do

takich baz. Przykładowo, Doktorantka w rozprawie doktorskiej zwróciła uwagę, iż baza EnzyBase była ostatnio aktualizowana w 2016 r., a od listopada 2023 roku kolejna, największa baza sekwencji enzymów litycznych PhaLP nie jest już dostępna. Metody używane do detekcji sekwencji enzymów litycznych są detalicznie przedstawione przez Doktorantkę w podrozdziale 1.12. Obejmują one zarówno techniki bazujące na wyszukiwaniu enzymów na podstawie podobieństwa sekwencji, programy oparte na modelach hidden Markov models (HMMs) takie jak phiBiScan, czy metody oparte na uczeniu maszynowym (przykładowo Lypred, CWLy-SVM, CWLy-pred i CWLy-RF). Porównanie tych metod Doktorantka detalicznie zaprezentowała w Tabeli 4. W tabeli tej przedstawione są również potencjalne minusy raportowanych algorytmów takie jak bazy obejmujące nie tylko enzymy lityczne, ale także o aktywnościach antyoksydacyjnych, małe lub niezbalansowane grupy testowe czy używanie sekwencji syntetycznych (SMOTE). Głównym zarzutem podnoszonym przez mgr Sophię Bałdysz jest, jak już wspomniałam uprzednio, brak aktualnej dostępności czy brak stron internetowych odsyłających do poszczególnych narzędzi. **Tu kolejne pytanie, czy narzędzia bioinformatyczne wypracowane w trakcie pracy doktorskiej Pani Sophii Bałdysz są dostępne szerszemu gronu odbiorców?** W dobie antybiotykoodporności temat endolizyn bakteriofagowych czy szeroko pojętych enzymów litycznych jest istotny i dalej często podejmowany w literaturze. Powstają również nowe narzędzia bioinformatyczne, jak choćby DeepMineLys służące do identyfikacji lizyn w jelitowym mikrobiomie człowieka.

Powyższe uwagi czynią cel rozprawy doktorskiej jak najbardziej zasadnym. Według mojej oceny Pani mgr Sophia Bałdysz podjęła się rozwiązania istotnego problemu badawczego. Na pozytywną uwagę zasługuje również lista 6 celów szczegółowych, w tym przegląd dostępnych baz danych dotyczących enzymów litycznych czy weryfikacja eksperymentalna bioinformatycznych przesłanek. Metody użyte w trakcie pracy są bardzo dobrze opisane, zarówno te bioinformatyczne jak i dotyczące części eksperymentalnej. Nasuwają się jednak pytania dotyczące chociażby metod weryfikacji aktywności badanych lizyn. Doktorantka używała jedynie metody zymogramu. **Prosiłabym Doktorantkę o krótkie podsumowanie innych metod analizy aktywności zarówno enzymatycznej jak i bakteriobójczej lizyn.** Czy za pomocą zymogramu można zbadać aktywność bakteriobójczą badanych enzymów? Kolejne pytanie skąd u Doktorantki zainteresowanie metodami bioinformatycznymi? Poprosiłabym Doktorantkę również o krótkie podsumowanie opisanej w rozprawie metody, jakie są plusy i czy są jakieś minusy opracowanej metodyki w odniesieniu do metod już istniejących.

Przechodząc do sekcji Wyniki, w Tabeli 13 dotyczącej rodzin białek dodanych do zestawu enzymów litycznych znajduje się rodzina metalopeptydaz M23. Do rodziny tej należą nie tylko enzymy pochodzenia fagowego, ale również (jak Doktorantka wymieniła w Tabeli), bakteriocyny takie jak lizostafina produkowana przez bakterię *Staphylococcus simulans*. **Czy oprócz enzymów bakteriofagowych Doktorantka dołączyła do zestawu lizyn bakteriocyny?** Tytuł rozprawy doktorskiej

odnosi się bowiem jedynie do lizyn pochodzenia fagowego. Poprosiłabym Doktorantkę o odniesienie się do powyższej uwagi. Podobnie domena LysM (Lysin Motif) wchodzi w skład ponad 4000 białek nie tylko pochodzenia prokariotycznego, ale także białek występujących u eukariontów. O ile kinazy zawierające domenę LysM pochodzące z roślin z pewnością łatwo jest odróżnić od białek fagowych, o tyle pytanie dotyczy odróżnienia lizyn fagowych od enzymów bakteryjnych takich jak autolizyny. Autolizyny posiadają podobną, jeśli nie identyczną specyficzność substratową jak endolizyny fagowe, jednak ze względu na ścisłą regulację ich aktywności (tak aby nie degradowały produkującej je komórki bakteryjnej) nie są brane pod uwagę jako środki bakteriobójcze. Dlatego ważne jest rozróżnienie tych dwóch typów enzymów litycznych.

W pracy podobały mi się wnioski odnośnie nierównocennego badania lizyn występujących w naturze. Niektóre klastry lizyn zawierały 20 modeli, inne 2 modele, co może sugerować, że istnieją jeszcze grupy lizyn nie w pełni zbadane. Podoba mi się również część pracy dotycząca wspólnego występowania różnych domen w sekwencjach lizyn i możliwości ich wymiany. Analizy typu bigram przedstawiają dość klarowny rozkład poszczególnych domen w sekwencjach lizyn i ich wzajemne położenie. Ciekawym jest stwierdzenie, że domeny Amidaz typu 2 często współlistnieją w białkach z domenami typu CHAP i SH3, z których dwie ostatnie często istnieją w powtórzeniach. Analiza właściwości fizykochemicznych lizyn w porównaniu z enzymami o innej funkcji jest również ciekawa. W badaniach Doktorantka wskazała na mniejszą obecność β -kardek w strukturach lizyn i z kolei podwyższoną ilość skrętów. Doktorantka wskazała również na większą ilość tryptofanów, fenyloalaniny i tyrozyny w sekwencjach lizyn co może być związane z obecnością tych reszt aminokwasowych w centrach katalitycznych enzymów litycznych.

Doktorantka przeprowadziła również walidację opracowanego narzędzia bioinformatycznego opartego głównie na MLPC (ang. multi-layer perceptron classifier) używając nowych genomów bakteriofagowych zdeponowanych w bazie NCBI po listopadzie 2023 r. Narzędzie wykazało obecność mniejszej liczby lizyn niż przewidziana przez osoby deponujące, jednak udało się wytypować 19 dodatkowych białek jako enzymy o potencjalnej aktywności litycznej. Co najmniej 9 z tych enzymów zostało sklasyfikowanych jako VALs. Narzędzie pozwoliło również na wytypowanie pierwszego enzymu litycznego o aktywności przeciwko *Proteus mirabilis*.

Ponadto użycie bazy RepLysin66 z 66 profilami HMM pozwoliło na identyfikację enzymów wykazujących aktywność wobec bakterii z grupy *Enterococcus*. Kilka z enzymów wytypowanych jako lizyny spośród sekwencji badanych było nadprodukowanych i oczyszczonych, a ich aktywność potwierdzona w testach *in vitro*. Baza RepLysin66 pozwoliła również na identyfikację białka litycznego PolaR wykazującego aktywność przeciwko *Rothia mucilaginosa* czy *Rothia dentocariosa*. Jest to pierwszy enzym tego typu wyizolowany z fageomu błony śluzowej żołądka. Powyższe przykłady

wskazują na użyteczność RepLysin66 w poszukiwaniu nowych enzymów litycznych w próbkach metagenomowych.

Uwagi edytorskie

- Brak numeracji stron nieco utrudnia czytanie pracy. Przykładowo, w załączonym do pracy spisie tabel znajdują się odsyłacze do konkretnych stron, jednak poszczególne tabele ciężko zlokalizować.
- Praca zawiera nieliczne błędy np. niepełna nazwa przytaczanego Rozdziału 3.7 Classification of lytic and non-lytic proteins: model selection and).
- Przy dużych tabelach takich jak Tabela 1 nagłówki poszczególnych kolumn mogłyby być również umiejscowione na kolejnej stronie
- W rozdziale 1.3.3 Figura 4 dobrze by było podać numery PDB przedstawionych struktur.
- Figury 8 i 10 są dość nieczytelne

Ponadto, jakość zymogramu prezentowanego jako Figura 33 nie jest zadowalająca, a przejaśnienia nie są dobrze widoczne. Z opisanego przez mgr Sophię Bałdysz metody wynika, że elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, a dopiero w kolejnych etapach żel poddawano renaturacji. Migracja zatem enzymu #11 jako dimer jest, moim zdaniem, mało prawdopodobna. Bardzo ładny zymogram przedstawia Figura 34. Tu nie ma wątpliwości, że badane enzymy mają aktywność lityczną. W przypadku enzymu #11, ponieważ jest to niezbadane dotychczas białko, radziłabym użycie niezależnej od zymogramu metody potwierdzającej jego aktywność enzymatyczną. Powyższa uwaga nie wpływa jednak na wysoką wartość merytoryczną pracy Pani mgr Sophii Bałdysz.

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani Sophii Bałdysz spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wiedza teoretyczna Doktorantki w przedstawionym temacie jest rzetelna, poparta najnowszymi doniesieniami ze świata literatury. Dobrze przedstawiona metodyka, w większości klarowna prezentacja wyników i wyciągnięte wnioski świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę. Na pozytywne podkreślenie zasługuje również umiejętność Doktorantki połączenia pracy *in silico* z walidacją eksperymentalną otrzymanych predykcji teoretycznych. Praca przedstawia oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego jakim jest brak aktualnych narzędzi bioinformatycznych stosowanych do identyfikacji nowych enzymów litycznych.

Wniosuję do rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Sophii Bałdysz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Final conclusion

In summary, Ms. Sophia Bałdysz's doctoral dissertation meets the conditions specified in art. 187 sec. 1-2 of the Act of 20 July 2018 - Law on Higher Education and Science. The theoretical knowledge of the PhD student in the presented topic is reliable, supported by the latest reports from the literature. Well-presented methodology, mostly clear presentation of results and conclusions drawn, demonstrate the ability of the PhD student to independently conduct scientific work. The PhD student's ability to combine *in silico* work with experimental validation of the obtained theoretical predictions also deserves positive emphasis. The work presents an original solution to a significant scientific problem, which is the lack of current bioinformatic tools used to identify new lytic enzymes. I recommend the scientific council of the discipline of biological sciences of Adam Mickiewicz University to proceed M.Sc. Sophia Bałdysz to the further stages of the doctoral procedure.

Gdańsk, 2025-01-02

UNIWERSYTET GDAŃSKI
KATEDRA MIKROBIOLOGII

dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG

dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG