

poniedziałek, 21 stycznia 2019

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Ropelewskiej pt.: "Znaczenie N-końcowej domeny oraz struktury czwartorzędowej proteazy Lon *Escherichia coli*".

Jednym z podstawowych mechanizmów umożliwiających przeżycie mikroorganizmom w środowisku jest ich zdolność adaptacji do zmieniających się warunków. Bakteria musi szybko i właściwie reagować na bodźce środowiska poprzez globalne zmiany na poziomie regulacji ekspresji genów, poprzez modyfikacje potranskrypcyjne oraz potranslacyjne. Równie ważne jak włączenie ekspresji genów właściwych dla danego środowiska czy też stanu fizjologicznego komórki są zdolności do degradacji niepotrzebnych czy też uszkodzonych transkryptów i białek, co zabezpiecza komórkę przed gromadzeniem się toksycznych, niefunkcjonalnych agregatów oraz pozwala na pozyskanie aminokwasów oraz nukleotydów bez dodatkowego wysiłku energetycznego. Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest proteaza Lon pełniąca funkcje regulacyjne degradując zarówno białka zdenaturowane podczas warunków stresowych jak i białka podstawowych procesów metabolicznych uczestnicząc w zachowaniu w komórce proteostazy. Pracę swą Doktorantka mogła oprzeć o ogrom wiedzy i doświadczenia w badaniach proteaz bakteryjnych promotora pracy, Pana prof. dr hab. Igora Koniecznego.

Biorąc pod uwagę wciąż ograniczoną wiedzę o N-terminalnej domenie proteazy Lon *E. coli*, biologicznym znaczeniu tworzenia różnych czwartorzędowych struktur przez badane białko oraz znaczeniu N-końcowej domeny dla aktywności białka Lon postawiony przed Doktorantką cel badań należy uznać za w pełni uzasadniony i niezwykle ciekawy.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy dotyczący roli białek opiekuńczych, dezagregaz i proteaz w proteostazie komórkowej oraz mechanizmów regulacji



proteolizy. Ze względu na podjęty temat pracy obszerna część wstępu poświęcona została proteazom AAA+ *E. coli* w tym proteazie Lon będącej przedmiotem niniejszej dysertacji.

Wstęp pracy jest napisany bardzo ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie” pracy jest również głęboko przemyślany i ściśle związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi Doktorantki.

Czy biorąc pod uwagę rolę proteazy Lon w powstawaniu komórek typu „persisters” oraz w wirulencji niektórych bakterii należałoby rozpatrywać to białko jako miejsce docelowe dla nowych antybiotyków? Proszę Doktorantkę o przedstawienie własnej opinii na ten temat na podstawie dostępnej literatury.

W rozdziale „Materiały i Metody” autor zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie całej gamy metod takich jak sieciowanie chemiczne *in vitro*, sączenie molekularne, wirowanie w gradiencie gęstości glicerolu czy pomiar dynamicznego rozpraszania światła dla analizy struktury czwartorzędowej wariantów Lon.

Część eksperymentalną autorka rozpoczęła od analizy fenotypowej wariantów delecyjnych Lon *E. coli* w warunkach *in vivo*. Doktorantka wykorzystwała obecne w Pracowni plazmidy kodujące formę „dziką” białka Lon oraz Lon E240K posiadającą mutację stabilizującą strukturę dodekameryczną, a także skonstruowane przez siebie plazmidy kodujące skrócone na N-końcu białko Lon. Należy podkreślić głęboko przemyślaną strategię delecji poszczególnych fragmentów genu kodujących poszczególne elementy strukturalne białka co zostało świetnie zobrazowane w Tabeli 1 oraz Ryc. 6 dysertacji. Szkoda może jedynie, że Doktorantka zdecydowała się zastosować plazmidowy układ ekspresyjny z indukowanym promotorem prowadzący do nadprodukcji badanych białek, pozostawia to zawsze niewielkie wątpliwości na ile obserwowany efekt fenotypowy wynika z badanej modyfikacji białka a na ile z jego nadprodukcji w komórkach bakteryjnych. Biorąc pod uwagę rolę proteazy Lon w proteolizie białka SulA szczepy z poszczególnymi „wariantami” Lon były analizowane pod kątem długości komórek oraz przeżywalności w warunkach stresowych. Doktorantka obserwowała nieznaczne różnice w długości komórek, w których ekspresji poddano gen typu „dzikiego” w porównaniu do



komórek noszących geny kodujące skrócone formy białka Lon. Różnice te stały się znacznie bardziej spektakularne kiedy bakterie zostały poddane działaniu promieniowania UV, co korelowało z ich zdolnością do przeżywania zastosowanych dawek promieniowania wyłącznie dla komórek z nadprodukcją formy „dzikiej” białka Lon. Doktorantka słusznie konkluduje, że wyłącznie kompletna forma białka Lon umożliwia odblokowanie podziałów komórkowych po ekspozycji na czynnik mutagenny. Usunięcie nawet 46 N-końcowych aminokwasów wyraźnie upośledzało ten proces. Autorka nie obserwowała natomiast różnic w przeżywalności badanych szczepów w zależności od temperatury, potwierdzając jednocześnie zwiększoną ilość białka Lon pod wpływem szoku termicznego. Wydaje mi się, że dla potwierdzenia tej obserwacji niezbędne byłoby jednoczesne zbadanie poziomu białka Lon oraz jednego z białek kontrolnych, którego ekspresja nie jest regulowana podczas szoku termicznego oraz przeprowadzenie oceny ekspresji genu na poziomie mRNA. Przeprowadzony eksperyment nie odpowiedział jednoznacznie na pytanie na ile akumulacja Lon w temp. szoku termicznego jest zależna od zwiększonej ekspresji a na ile od stabilności białka Lon w porównaniu do innych białek komórkowych.

Do tej części pracy chciałbym zadać Doktorantce pytanie. Promieniowanie UV powoduje uszkodzenia naprawiane przez fotoreaktywację oraz system NER a dopiero w dalszej kolejności mogące prowadzić do indukcji systemu SOS. Czy fotolizy lub któreś z białek NER mogą być substratami dla proteazy Lon? Czy autorka próbowała zastosować alternatywnie inny czynnik mutagenny indukujący SOS? W tej części pracy autorka nie badała białka Lon Δ 300 oraz Lon E240K, ciekawy jestem jakich zmian w morfologii komórek moglibyśmy się spodziewać po zadziałaniu czynnikiem mutagennym, szczególnie w przypadku Lon E240K.

W dalszej części pracy Doktorantka skoncentrowała się na nadprodukcji i oczyszczeniu rekombinowanej proteazy Lon w formie „dzikiej”, zmutowanej w pozycji 240 oraz w wersjach skróconych. Uzyskane preparaty białkowe były poddane analizom strukturalnym. Badanie przeprowadzone metodą dichroizmu kołowego wykazało brak zaburzeń w strukturze drugorzędowej rekombinowanych białek. Elektroforeza natywna wskazała, że wszystkie analizowane białka mają zdolność do tworzenia oligomerów lub agregatów a formy skrócone akumulują również formy monomeryczne. Przeprowadzona analiza sieciowania chemicznego wskazywało, że delekcja 160 aminokwasów N-końca upośledza tworzenie struktury dodekamerycznej lub obniża stabilność oligomeru Lon. Z drugiej strony sączenie molekularne



wskazywało na zdolność wszystkich badanych białek do tworzenia struktur o masie większej niż 624 KDa odpowiadających dodekamerom lub agregatom. Przeprowadzone wirowanie w gradiencie gęstości glicerolu wskazywało, że struktury dodekameryczne tworzone są przez formę „dziką” oraz mutantu E240K białka Lon i ewentualnie mutantu $\Delta 46$ stabilizowanego Sumo, wskazując na obecność reszt aminokwasowych zaangażowanych w tworzenie tych struktur w obrębie aminokwasów 46-160. Z drugiej strony niewielką ilość potencjalnych struktur dodekamerycznych można dopatrzeć się również dla Sumo-Lon $\Delta 160$ (Ryc. 20) co mogłoby wskazywać, że cały N-koniec białka Lon jest zaangażowany w tworzenie lub stabilizację dodekamerów. Za niezwykle cenne uważam krytyczne podejście Doktorantki do wyników uzyskanych w analizach strukturalnych przejawiające się choćby wielością zastosowanych metod badawczych. **Ciekawy jestem przemyśleń Doktorantki wskazujących, która z zastosowanych metod okazała się najbardziej przydatna i generowała najbardziej wiarygodne i jednoznaczne w interpretacji wyniki?**

W ostatniej części pracy Doktorantka przeprowadziła analizę właściwości biochemicznych oczyszczonych wariantów Lon. Ze względu na brak możliwości uzyskania białka SulA oraz brak aktywności proteazy Lon w stosunku do chimerycznego białka Sul20GFP analizy zdolności wiązania substratów oraz ich degradacji Doktorantka przeprowadziła z wykorzystaniem białek TrfA oraz α -kazeiny. Przeprowadzone analizy wskazywały, że mutanty z delecją w obrębie N-domeny proteazy Lon wykazują mniejszą specyficzność oddziaływania z substratami oraz charakteryzują się upośledzoną aktywnością proteolityczną względem badanych substratów. Doktorantka wykazała również, że N-terminalna domena oraz czwartorzędowa struktura proteazy Lon są istotne w procesie hydrolizy ATP. W przeprowadzonych badaniach siły oddziaływania badanych wariantów proteazy Lon z substratem Doktorantka zastosowała technikę ELISA. **Ciekawy jestem czy autorka rozważała zbadanie siły oddziaływania pomiędzy enzymem i substratem z wykorzystaniem metod alternatywnych takich jak SPR czy termoforeza? Czy w opinii Doktorantki takie analizy mogłyby wnieść dodatkowe informacje o charakterze badanych oddziaływań?**

Dyskusja pracy została napisana profesjonalnie, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Szczególnie pomocne dla czytelnika są zamieszczone w tej części pracy Tabele i ryciny

obrazujące omawiane zagadnienia. Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę mają silne podstawy w prezentowanych wynikach i można uznać je jako w pełni uprawnione.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Małgorzaty Ropielewskiej uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

