

Warszawa, 12 kwietnia 2018

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl
tel: (22) 55 43 600

Rada Wydziału Biologii i Biotechnologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Kamila Deryło

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Kamila Deryło zatytułowana "Rybosomalne centrum GTPazowe jako element adaptacji komórki do warunków stresowych" została przedłożona Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Rozprawa została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej pod kierunkiem promotora prof. dra hab. Marka Tchórzewskiego oraz dr Barbary Michalec-Wawiórki jako promotora pomocniczego.

Celem pracy badawczej było określenie roli centrum GTPazowego rybosomu eukariotycznego w regulacji translacji w warunkach stresu.

Proces translacji jest kluczowym elementem życia komórki, gdyż w tym procesie na bazie informacji zawartej w mRNA produkowane są białka. Kluczową rolę w tym procesie pełni rybosom, kompleks rybonukleoproteinowy, który jest "stanowiskiem pracy" dla mRNA, tRNA oraz zewnętrznych czynników białkowych. Translacja jest niezwykle skomplikowana, składa się z kilku etapów, a każdy z nich, oprócz rybosomu, wymaga precyzyjnego działania wielu innych elementów. Nie tylko tRNA czy mRNA są kluczowe ale także właściwe translacyjne czynniki białkowe, które w odpowiednim etapie translacji muszą się przyłączyć i potem oddysocjować od rybosomu. Proces ten jest także niezwykle dynamiczny, nie tylko z powodu dyfuzji i wiązania się czynników białkowych, ale także samej dynamiki wewnętrznej rybosomu.

Translacja nie jest procesem spontanicznym w komórce ale wymaga energii, która pochodzi z hydrolizy GTP. GTP jest "przyniesione do rybosomu" przez czynniki translacyjne i w odpowiednich etapach translacji energia jest uwalniana z GTP przy udziale fragmentu dużej podjednostki rybosomu nazwanego centrum GTPazowym. W rybosomach eukariotycznych centrum GTPazowe jest w podjednostce 60S i stanowią je tzw. pętla sarcynowo-rycynowa, pętla tiostreptonowa oraz kciuk rybosomowy złożony z białek uL10, uL11 i dimeru P1-P2. Translacja, jak i inne procesy komórkowe, jest regulowana ale nie poznaliśmy jeszcze wszystkich mechanizmów, które za tę regulację odpowiadają. Na pewno zachodzi regulacja na poziomie inicjacji translacji, gdyż w tym etapie bierze udział wiele czynników białkowych.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się więc regulatorowej funkcji rybosomu. Powstała hipoteza, że rybosomy są heterogenne i ta różnorodność odpowiada za ich różną funkcję. Różnorodność strukturalna może wynikać z różnych białek rybosomowych (zmiany ich ilości, modyfikacji potranslacyjnych) lub modyfikacji rRNA. Wynika to pewnie z konieczności dostosowania się

translacji do różnych warunków środowiska. W laboratorium prof. Tchórzewskiego, promotora rozprawy, badania regulacji translacji na poziomie rybosomów były są prowadzone od wielu lat. W wyniku tych badań okazało się, że ważnym elementem regulatorowym jest GAC, czyli centrum GTPazowe rybosomu. Białka wchodzące w skład GAC, na różnych etapach formowania rybosomu, były więc przedmiotem badań mgra Deryło.

Rozprawa doktorska mgra Kamila Deryło została napisana w języku polskim i jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie*. Rozprawa zawiera też obszerną bibliografię odwołującą do 189 artykułów.

W Rozdziale I zatytułowanym *Wstęp* autor opisuje funkcję i strukturę rybosomu. Przedstawia historyczny rys jak odkryto istnienie rybosomów. Skupia się głównie na rybosomach eukariotycznych, gdyż te są przedmiotem jego badań. Opisuje dokładniej GAC, czyli centrum GTPazowe rybosomu i porównuje GAC u różnych organizmów. Omawia także proces formowania się dojrzałych rybosomów w komórkach, czyli ich biogenezę. Skupia się na tworzeniu centrum GTPazowego podczas biogenezy rybosomu, gdyż jest to ostatni ważny etap dojrzewania podjednostki pre-60S. Okazuje się, że zamiast kompleksu białek P1/P2 w pre-60S odnajdujemy białko Mrt4, które jest paralogiem białka uL10. Wymiana białek do osiągnięcia przez strukturę GAC formy dojrzałej strukturalnie jest więc istotnym etapem biogenezy rybosomu. Dodatkowo taka wymiana może pełnić rolę regulatorową, gdyż zamiana Mrt4 na uL10 wymaga udziału fosfatazy. Część procesów zachodzi w cytoplazmie a część w nukleoplazmie, co komplikuje badanie tych procesów.

W kolejnej części *Wstępu* autor rozprawy omawia regulatorowe funkcje rybosomu, opisuje teorię wyspecjalizowanych rybosomów oraz inne funkcje białek rybosomowych. Okazuje się, że rybosomy mogą się różnić także w ramach jednego organizmu. Podkreśla, że teoria regulacji ekspresji informacji genetycznej na poziomie translacji nie jest nowa ale nie wszystkie jej aspekty zostały zbadane. Wyspecjalizowane rybosomy są tego przykładem, a także zmienność białek w GTPazowym centrum rybosomu, które było przedmiotem badań autora rozprawy.

W Rozdziale II przedstawione są krótko cele rozprawy. Głównym celem autora było zbadanie roli białek wchodzących w skład GAC (uL10 i dimeru P1-P2) w komórkach eukariotycznych w warunkach stresu. W szczególności mgr Deryło chciał zbadać jak fosforylacja i obecność C-końca białka Mrt4, które w procesie dojrzewania rybosomu jest wymieniane na uL10, wpływają na adaptację metabolizmu komórki w warunkach stresu. Skupił się także na wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka uL10. Zastosował różne techniki biochemiczne oraz mikroskopii konfokalnej.

W Rozdziale III *Materiały i Metody* autor rozprawy przedstawia eksperymentalne protokoły badawcze. Najpierw techniki genetyczne (użyte wektory DNA i przygotowanie konstruktów genetycznych), potem opisuje warunki hodowli linii komórkowych, frakcjonowanie komórek i analizę Western-Blot, a następnie techniki mikroskopii konfokalnej, którymi obrazował komórki.

Rozdział zatytułowany *Wyniki* poświęcony jest opisaniu wyników autora. Rozdział ten został podzielony na dwa główne podrozdziały. Pierwszy podrozdział dotyczy udziału białka Mrt4, które występuje w niedojrzałych rybosomach i jest zamieniane w procesie biogenezy podjednostki 60S na uL10, oraz wariantów Mrt4, w przystosowaniu komórki do warunków stresu. Drugi podrozdział dotyczy białek uL10, P1 i P2 struktury GAC w dojrzałych rybosomach i funkcji tych białek w warunkach stresu komórkowego.

Jeśli chodzi o rolę białka Mrt4 to mgr Deryło przebadał cztery jego warianty: białko natywne, białko nie zawierające C-końca, białko w którym reszty seryny zastąpiono albo resztami alaniny albo kwasu glutaminowego. Białko Mrt4 jest zachowane ewolucyjnie w komórkach eukariotycznych, jednak region jego C-końca jest zróżnicowany. Wiadomo, że taki C-końcowy fragment jest fosforylowany przez kinazę CK2 w białkach P, jednak do tej pory nie zbadano jak jest w przypadku białka Mrt4. Po

przygotowaniu wariantów Mrt4 w fuzji z białkiem DsRed, autor zbadał wewnątrzkomórkową lokalizację (jąderkową bądź cytoplazmatyczną) tych białek w komórkach HeLa w warunkach stresu i bez. Warunki stresu indukowane były różnymi antybiotykami.

Stres wywołany aktynomycyną D to tzw. stres jąderkowy; jąderko jest odpowiedzialne za syntezę rRNA i pierwsze etapy biogenezy rybosomów, gdyż większość białek rybosomowych jest transportowana z cytoplazmy do jąderek w celu formowania pre-rybosomów. Tak więc stres jąderkowy powinien hamować wczesne etapy biogenezy rybosomów. Stres wywołany leptomycyną B miał określić wpływ hamowania późniejszych etapów formowania się rybosomów, mianowicie eksportu z jądra do cytoplazmy. W niektórych doświadczeniach użyto też cząsteczek 5-fluorouracylu, który hamuje biogenezę rybosomu na późnych etapach formowania się 28S rRNA.

W wyniku obrazowania w różnych warunkach stresu oraz kolokalizacji białek Mrt4 z białkiem YFP-fibrylaryna i analiz Western-Blot autor stwierdził, że C-koniec Mrt4 wpływa na lokalizację białka w stresie jąderkowym indukowanym aktynomycyną D. Wariant Mrt4 bez C-końca był zlokalizowany w cytoplazmie a nie i w cytoplazmie i jąderku. Podobnie wariant, który miał ufosforylowany C-koniec zaburzał zdolność przemieszczania białka Mrt4 między jądrem a cytoplazmą.

W drugiej części rozdziału *Wyniki* autor zajmował się lokalizacją wewnątrzkomórkową białek wchodzących w skład GAC, uL10 i dimeru P1/P2. Badania wykazały, że białko uL10 może się pojawiać w formie niezwiązanej z rybosomem. Autor więc dalej badał szybkość dyfuzji tego białka oraz kilku innych (m.in. uL16 i uL4) wewnątrz komórek techniką FRAP. Białka były skoniugowane, albo na N- albo na C-końcu z fluorescencyjnym białkiem GFP. Białka, które integrowały się z rybosomem wykazywały niską mobilność, a białka wolne wykazywały dużą ruchliwość. Okazało się, że białko uL10 skoniugowane z GFP w warunkach stresu jąderkowego akumuluje się w cytoplazmie, najprawdopodobniej w formie monomerycznej. Ten fakt nie był do tej pory znany, gdyż białko w warunkach natywnych w komórce nie wykazuje innej mobilności w cytoplazmie, więc jest najpewniej związane z rybosomem. Ponadto procedura doświadczalna, którą autor opracował pozwoliła po raz pierwszy zbadać mobilność rybosomu wyznakowanego fluorescencyjnie w komórkach eukariotycznych.

W następnych etapach pracy autor analizował mobilność heterodimeru P1/P2, który także wchodzi w skład GAC, aby sprawdzić czy mobilność białek P1/P2 jest skorelowana z mobilnością uL10. W warunkach natywnych dimer P1/P2 był zasocjowany z rybosomem ale w warunkach stresu wywołanego aktynomycyną D miał też zwiększoną ruchliwość, choć nie tak bardzo jak koniugat GFP-uL10.

Dodatkowo, mgr Deryło potwierdził zjawisko akumulacji uL10 w cytoplazmie pod wpływem stresu jąderkowego ale wywołanego innym czynnikiem, 5-fluorouracylem, który oddziałuje na późniejsze etapy biogenezy rybosomu (blokuje dojrzewanie 28S i 18S RNA). Aby stwierdzić, czy obserwowane zjawisko nie jest specyficzne tylko dla komórek HeLa, mgr Deryło przeanalizował też mobilność białka uL10 w innych komórkach, mianowicie w komórkach fibroblastów mysich NIH3T3, i otrzymał podobne wyniki jak dla komórek HeLa, czyli białko uL10 akumulowało się w cytoplazmie w warunkach stresu.

Dalej autor rozprawy chciał sprawdzić, czy obecność wolnego białka uL10 w cytoplazmie wynika z jego oddysocjowania od rybosomu czy uL10 jest białkiem nowo syntezowanym. Zastosował inne białko fluorescencyjne, fotoaktywne, o nazwie Dendra, które też skoniugował z białkiem uL10 na N-końcu, podobnie jak w przypadku koniugatu z GFP. Tutaj autor także potwierdził, że w warunkach stresu wywołanego aktynomycyną D białko uL10 występuje nie tylko w rybosomie 80S, ale także we frakcji cytoplazmatycznej. Dyfuzja uL10 wzrastała w takich warunkach, co potwierdzono różnymi technikami obrazowania fluorescencyjnego. Ogólnie wcześniejsze wyniki z użyciem GFP zostały potwierdzone przy użyciu białka Dendra. Następnie, żeby odpowiedzieć na pytanie jakie jest źródło

uL10 w cytoplazmie w warunkach stresu autor zastosował technikę FRAP-AC, która umożliwiła mu monitorowanie mobilności koniugatów Dendra-uL10, które przed wprowadzeniem stresu komórkowego były zasocjowane z rybosomem. Takie monitorowanie potwierdziło, że uL10 pojawiające się w cytoplazmie pochodzą z uwolnienia się uL10 z rybosomów. Ostatni etap badań miał na celu sprawdzenie, czy uwolnienie uL10 z rybosomów do cytoplazmy w stresie jąderkowym jest procesem odwracalnym po usunięciu stresu. Okazało się, że jest to proces nieodwracalny i białko uL10 nie asocjuje ponownie z rybosomem po usunięciu stresu.

Kolejny rozdział to *Dyskusja*, w której autor podkreśla wagę regulacji translacji na poziomie samych rybosomów czy ich biogenezy, która może być korzystna dla komórki w przypadku konieczności szybkiego reagowania na stres. Podaje też przykłady innych białek rybosomowych oraz fosforylacji białek, u których też stwierdzono pewne funkcje regulatorowe w warunkach stresu. W *Dyskusji* są jednak głównie wnioski z wyników badań autora.

Po *Dyskusji* znajduje się *Podsumowanie* z proponowanym schematem jak centrum GTPazowe dostosowuje się do stresu jąderkowego, dorobek naukowy autora rozprawy, streszczenie w języku angielskim i spis literatury.

Czytając rozprawę zainteresowało mnie kilka kwestii dotyczących wyników badań i mam też kilka uwag dotyczących prezentacji.

- Rozprawa jest napisana w języku polskim natomiast wszystkie rysunki określane są i w tekście i w podpisach jako Fig. Lepiej było użyć skrótu Rys. i odwoływać się w tekście do rysunków a nie Fig. Słowo Figura nie jest stosowane w polskojęzycznych publikacjach w kontekście rycin czy rysunków.

Strona 4, średnica 20-25 nm dotyczy rybosomów bakterii bo eukariotyczne a zwłaszcza ludzkie są chyba większe?

Szkoda, że wszystkie rysunki we *Wstępie* zostały skopiowane z publikacji innych i żaden nie został wykonany przez autora. W części *Wyniki* podpisy pod wykresami i opisy osi są bardzo słabej jakości, przynajmniej na moim wydruku.

W rozprawie brakuje mi jakiegoś wstępu teoretycznego dotyczącego metodyki badawczej. W rozprawie znajdujemy raczej opisy techniczne, tak jak w publikacjach, a nie ma ogólnego poglądowego podejścia do technik, którego bym oczekiwała w rozprawie doktorskiej. Dopiero w *Wynikach* pojawiają się jakieś wyjaśnienia, ale tylko dotyczące technik mikroskopii konfokalnej.

Nie jest dla mnie jasne co oznaczają błędy na wykresach (jak były liczone, średnia i SD?) oraz jak jest istotność statystyczna różnic.

Białko GFP ma tendencję do dimeryzacji. Czy brano to pod uwagę i czy może używano jakiegoś mutantu GFP zapewniającego formę monomeryczną w komórkach? Chyba, że wiadomo, że koniugaty GFP z innymi białkami nie dimeryzują.

Czy białko uL10 jest też podobne strukturalnie do białka Mrt4, czy coś na ten temat wiadomo?

Rozprawa zawiera trochę drobnych językowych pomyłek. Nie obniżają one wartości rozprawy jednak część z nich dla porządku wypiszę.

- GAC jest częścią rybosomu, stanowi jego element, więc lepiej chyba pisać, że GAC znajduje się w dużej podjednostce rybosomalnej a nie "na" tej podjednostce.
- strona 19, dodatkowy nawias (kolor żółty)
- strona 25, powinno być "za pomocą antybiotyku G418"
- w wielu miejscach nie ma odstępu (spacji) po liczbie a przed jednostką lub raz jest odstęp a raz go nie ma, np. str. 34, 561nm, str. 29, 50μl
- strona 38, powinno być "zastąpić"
- strona 48, podpis pod rysunkiem 22, powinno być "powtórzeniach"
- strona 67, podpis pod rysunkiem 37, powinno być "strzałką"
- strona 68, podpis pod rysunkiem 39, powinno być "wybrany"
- strona 78, powinno być "nie jest w stanie"
- strona 87, powinno być "w obrębie"

Podsumowując, mgr Deryło podjął próbę zbadania mechanizmów adaptacji komórki do warunków stresu, w szczególności roli niektórych białek rybosomowych w procesie biogenezy rybosomu. Jednym z białek było białko o nazwie Mrt4, które wiąże się z podjednostką pre-60S w jąderku i jest następnie wymieniane na właściwe białko uL10 (paralog Mrt4) w dojrzałych cytoplazmatycznych rybosomach. Badania pozwoliły autorowi na zaproponowanie roli regulatorowej Mrt4 w procesie dojrzewania rybosomów, w szczególności formowania dojrzałej struktury GAC, w warunkach stresu jąderkowego. Autor pokazał także unikalne zachowanie się innego białka tworzącego dojrzałą strukturę GAC w translacyjnie kompetentnych rybosomach, mianowicie białka uL10. Białko to w warunkach stresu akumuluje się w cytoplazmie jako wolne białko nie związane z rybosomem. Taka akumulacja sugeruje jakieś pozarybosomalne funkcje tego białka. Rybosomy nie zawierające uL10 nie są zdolne do syntezy białek, a po zdjęciu stresu białko uL10 nie asocjuje ponownie z rybosomem. uL10 najprawdopodobniej oddziałuje z innymi białkami w cytoplazmie. Tak więc autor pokazał, że białka struktury GAC mogą mieć funkcje regulatorowe. Dodatkowo, autor rozprawy przyczynił się do opracowania nowego protokołu eksperymentalnego pozwalającego na śledzenie dynamiki nowo powstałych białek w komórkach. Wykorzystał też wiele technik obrazowania pod mikroskopem konfokalnym, z różnymi białkami fluorescencyjnymi i techniki te opanował perfekcyjnie.

Warto podkreślić, że mgr Deryło ma już bardzo dobry dorobek publikacyjny w czasopismach z listy JCR. Tematyka rozprawy zawiera się w dwóch publikacjach (w *BBA - Molecular Cell Research* i *Int. J. Biochemistry and Cell Biology*). W jednej z publikacji mgr Deryło jest pierwszym autorem. Oprócz tego mgr Deryło jest współautorem pięciu innych prac.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgra Kamila Deryło stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę autora w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wobec tego rozprawa doktorska mgra Deryło spełnia wszystkie warunki ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Kamila Deryło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Trzejska