



Warszawa, 25 marca 2019

Recenzja pracy doktorskiej Elizy Molestak

„Analiza funkcjonalna rybosomalnych białek-P na modelu *Saccharomyces cerevisiae*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Elizy Molestak została wykonana pod kierunkiem prof. Marka Tchórzewskiego. Kierowany przez niego zespół od lat z sukcesem zajmuje się badaniem struktury i funkcji rybosomalnego centrum GTPazowego odpowiedzialnego za stymulację aktywności czynników translacyjnych o charakterze GPTaz. Centrum GTPazowe jest konserwowanym ewolucyjnie elementem dużej podjednostki rybosomalnej, złożonym z pętli rRNA o określonej sekwencji i kompleksu białek tworzących charakterystyczną strukturę *stalk* kciuka rybosomalnego. W eukariotycznym rybosomie kompleks ten składa się z białek uL11 i uL10, które stanowi kotwicę dla heterodimerów białek P1-P2, nie związanych bezpośrednio z rRNA. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* cztery różne białka P, P1A, P1B, P2A, and P2B, tworzą dwa heterodimery, P1A-P2B i P1B-P2A. W tej formie białka P są związane z wysoce specyficznym helikalnym rejonem C-terminalnej części uL10, zwanej domeną P i tworzą pentamer uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A). Obecność domeny P białka uL10 jest wystarczająca do funkcjonowania rybosomu i białka P nie są niezbędne. Badania *in vitro* wykazały, że rybosomy eukariotyczne pozbawione białek of P1/P2 są jednak upośledzone w stymulacji hydrolizy GTP przez czynniki elongacyjne EF-1A and EF-2. Celem recenzowanej pracy doktorskiej było sprecyzowanie roli białek P1/P2 w kontroli wzrostu modelowego organizmu eukariotycznego, drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i regulacji translacji w komórkach drożdży w układzie *in vivo*. Tak postawiony cel pracy został w pełni zrealizowany. Większość danych przedstawionych w pracy doktorskiej wchodzi w skład publikacji, która ukazała się ostatnio w prestiżowym czasopiśmie *Molecular and Cellular Biology*, której mgr Eliza Molestak jest drugim autorem.

Podsumowanie wyników

Doktorantka wykorzystała poprzednie osiągnięcia naukowe prac zespołu, które wskazywały rejony białka uL10 niezależnie wiążące heterodimery P1A-P2B i P1B-P2A oraz skonstruowane w pracowni mutanty drożdżowe uL10 pozbawione jednego lub obu z tych rejonów. W kontrolnym eksperymencie Western blot potwierdziła obecność pełnego białka uL10 w szczepie dzikim i odpowiednio skróconych form uL10 w mutantach. Potwierdziła również, że mutanty są, odpowiednio, pozbawione pojedynczego heterodimeru P1B-P2A lub obu heterodimerów P1A-P2B i P1B-P2A.

W ramach realizacji celu pracy doktorskiej Eliza Molestak przeprowadziła najpierw charakterystykę fenotypową mutantów. Stwierdziła, że mutant uL10 pozbawiony obu heterodimerów białek P rośnie wolniej, szczególnie na pożywkach z mniej preferowanym przez drożdże źródłem węgla jak galaktoza, zaś na pożywce z glicerolem nie rośnie wcale. Defekt wzrostu tego mutantu na pożywce z galaktozą

był komplementowany poprzez wprowadzenie dzikiej formy genu na plazmidzie. Natomiast wprowadzenie do szczepu plazmidu zapewniającego ekspresję zmutowanej formy uL10 powodowało defekt wzrostu na pożywkach z galaktozą i glicerolem, wskazując na dominujący negatywny charakter mutanta. Wynik ten został w interesujący sposób skomentowany w kontekście konkurencyjności wiązania do rybosomu formy uL10 niezdolnej do oddziaływania z heterodimerami białek P.

Przeprowadzono również wnikliwe badania, które dowodzą, że mutanty uL10 mają zaburzone procesy związane z podziałem, kontrolą cyklu komórkowego i długości życia. Reasumując, brak związanych do rybosomów białek P ma szerokie konsekwencje dla fizjologii komórki, co doktorantka w elegancki sposób wykazała.

Zasadnicza część wyników dotyczy analizy translacji w mutantach uL10. Jestem pod wrażeniem zdolności technicznych Elizy Molestak, jej umiejętności badania tempa włączania znakowanej metioniny do syntetyzowanych białek i otrzymywania profili rybosomów. Aby zbadać wpływ mutantów uL10, a przez to multiplikacji białek P, na tempo elongacji translacji *in vivo*, doktorantka analizowała osobno inkorporację ³⁵S-metioniny do całkowitej frakcji nowo-syntetyzowanych białek i frakcji białek uwolnionych z rybosomu. Dzięki zastosowaniu odpowiednich kontroli i starannemu wykonaniu eksperymentu, pokazała i w przekonujący sposób opisała brak wpływu obecności białek P na tempo elongacji translacji. Kolejny wynik negatywny przyniosła wnikliwa analiza profili polisomów w mutantach uL10. Końcowy wniosek, że zmiany w kompleksie białek P z uL10 nie wpływają znacząco na wydajność aparatu translacji, choć jest zaskakujący, nie budzi wątpliwości ze względu na perfekcyjne wykonanie eksperymentów.

Analiza profili rybosomalnych w obecności cykloheksymidu sugerowała zmniejszoną wrażliwość mutantu uL10_{Δh1h2} na ten antybiotyk, co zostało potwierdzone w testach wzrostowych. Wykazano zmniejszoną wrażliwość mutantów uL10 na cykloheksymid i sordarin, a zwiększoną wrażliwość na G418, paromomycynę i higromycynę B, antybiotyki, które wpływają na wierność translacji. Fenotypy wzrostu znalazły odzwierciedlenie w wynikach analizy wydajności translacji w obecności G418 i sordarinu. Obniżenie tempa inkorporacji ³⁵S metioniny w mutancie było mniejsze niż w szczepie dzikim w obecności sordarinu, lecz większe niż w szczepie dzikim w obecności G418. Ciekawe wyniki doktorantka uzyskała analizując wpływ sordarinu na profile polisomów. W szczepie dzikim sordarin powodował zwiększenie frakcji monosomów 80S w stosunku do polisomów, których poziom był obniżony. Wynik ten może wskazywać na blokowanie przez ten antybiotyk rekrutacji rybosomów 80S do translacji. Natomiast w mutancie uL10_{Δh1h2} blokada ta wydaje się być zniesiona, co sugeruje, że rybosomy pozbawione białek P mogą być w obecności sordarinu rekrutowane do aktywnej translacji. W końcowej partii pracy doktorantka analizowała wpływ mutantów uL10 na wierność translacji w układzie *in vivo*. Zastosowała w tym celu system reporterowy wykorzystujący zależną od błędności translacji ekspresję lucyferaz kodowanych przez odpowiednio zaprojektowane fuzje genowe. System ten doktorantka poddała najpierw starannej walidacji w kontrolnym układzie eksperymentalnym, potwierdzając, że poziom błędów generowany przez G418 w szczepie dzikim. Wykazała następnie, odpowiednio 2- i 3- krotny wzrost poziomu błędów w odczytywaniu kodonów w testowanych mutantach uL10. Co więcej, brak białek P powodował w mutancie uL10_{Δh1h2} znaczący, 1,5 krotny, wzrost częstotliwości zmian ramki odczytu o jeden nukleotyd w kierunku 3' (-1 frameshift). Wyniki te mają charakter nowatorski – wskazują na nieoczekiwaną rolę białek P w kontroli wierności translacji, obejmująca dokładność odczytu kodon-anty kodon a także translokacji rybosomu po matrycy mRNA.

Komentarz merytoryczny

Recenzowana praca reprezentuje wysoki poziom merytoryczny badań z dziedziny podstawowej biologii molekularnej. Podejmuje aktualny, bardzo istotny problem naukowy roli rybosomalnych białek P w regulacji translacji i kontroli metabolizmu komórki eukariotycznej.

Koncepcja pracy jest spójna, eksperymenty są zaplanowane logicznie, tak aby wykorzystać kilka podejść do rozwiązania problemu w jaki sposób białka P wpływają na maszynę translacyjną w modelowym organizmie eukariotycznym, drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Wykonanie eksperymentów jest perfekcyjne, opracowanie jest staranne, a komentarze właściwie wyważone. Wnioski i hipotezy postawione na podstawie uzyskanych wyników są w pełni uzasadnione.

Dyskusja jest dojrzała i przedstawia różne możliwości interpretacji wyników. Praca napisana jest w sposób, który wywołuje zainteresowanie tematem i pobudza do myślenia. Jest to ogromną zasługą doktorantki.

Mam tylko nieliczne zastrzeżenia, które nie umniejszają mojej pozytywnej opinii o recenzowanej pracy. Wymienię również komentarze, które chciałabym przedyskutować podczas obrony pracy.

1. Wstęp teoretyczny zbyt zdawkowo traktuje udział GTPaz eIF2, eIF5B i eRF3 w kontroli translacji u drożdży. Pominięto także kwestię oddziaływania tych czynników translacyjnych z centrum GTPazowym na rybosomie.
2. W rozdziale „Materiały i Metody” nie wspomniano o analizie izoelektroogniskowania, którą doktorantka wykorzystwała do identyfikacji poszczególnych białek P w wykorzystywanych w pracy doktorskiej szczepach, zaś panel dolny Rys. 17 przedstawiający wyniki tej analizy zawiera fragmenty dwóch różnych blotów.
3. We wstępnej analizie obecności białek P w mutantach uL10 (Rys. 17) wzięto pod uwagę tylko frakcję rybosomalną. Czy w mutantach można się spodziewać obecności wolnych białek P w cytoplazmie? Czy niezwiązane z rybosomem białka P mogą mieć wpływ na translację?
4. Brak wzrostu mutantu uL10_{Δh1h2} na pożywce z glicerolem, a w szczególności brak komplementacji tego defektu przez dziką formę genu kodującego uL10, sugeruje możliwość nieodwracalnej degradacji mitochondrialnego DNA i przejście tego szczepu w formę *rho*⁰. Zmniejszona w stosunku do szczepu kontrolnego ilość translacyjnie aktywnych rybosomów w mutancie uL10_{Δh1h2} może wiązać się z obniżonym tempem wzrostu tego mutantu spowodowanym brakiem funkcjonalnych mitochondriów. Czy taka ewentualność została wzięta pod uwagę; proszę o komentarz podczas obrony.
5. Cenna jest obserwacja braku wzrostu komórek szczepu dzikiego traktowanych G418 na podłożu z glicerolem/etanolem. Nie zgodziłabym się jednak z hipotezą sformułowaną w dyskusji, że defekt dekodowania informacji genetycznej może mieć wpływ na translację specyficznych mRNA, obstając przy poglądzie, że ma on charakter globalny. Analogiczne fenotypy (Gly-) opisano w literaturze dla mutantów drożdżowych *sup35* i *sup45*, w genach kodujących czynniki terminacji translacji. Mutanty te charakteryzują się wysokim poziomem błędności odczytów kodonów stop u drożdży i nie są to efekty mRNA-specyficzne. Prawdopodobnie tempo translacji jest niższe gdy komórki rosną na podłożu z niefermentowalnym źródłem węgla, gdyż tempo wzrostu jest obniżone. A więc może specyfika translacji na podłożu z niefermentowalnym źródłem węgla nie pozwala na

tolerowanie podwyższonego poziomu błędności w odczycie kodonów. W czasie obrony pracy chciałabym przedyskutować ten problem.

6. Dyskusja, rozpoczyna się od niezręcznego sformułowania, że regulacja translacji jest końcowym etapem kontroli proteomu komórkowego. Za etap finalny uznałabym raczej kontrolowaną degradację białek.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie dopuszczenie Pani mgr Elizy Molestak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką jakość wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.



Prof. Dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta