



Recenzja

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał
pt. „Charakterystyka funkcjonalna C-terminalnych fragmentów ludzkich białek P w
oddziaływaniu z białkami inaktywującymi rybosom”**

wykonanej pod kierunkiem
Prof. dr. hab. Marka Tchórzewskiego
oraz

dr. Przemysława Greli

W Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej

Zespół kierowany przez Prof. dr hab. Marka Tchórzewskiego od wielu lat zajmuje się badaniem struktury, funkcji i mechanizmów regulacji rybosomalnego centrum GTPazowego u różnych organizmów. Praca doktorska Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał stanowiła kontynuację tych badań. Głównym jej celem była charakterystyka interakcji pomiędzy białkami P rybosomalnego centrum GTPazowego i toksynami białkowymi inaktywującymi rybosom (w skrócie RIP od Ribosome-Inactivating Proteins). Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał badała kinetykę interakcji podjednostki katalitycznej rycyny (RTA) - toksyny należącej do białek RIP typu II oraz trichosantyny (TCS) - toksyny należącej do białek RIP typu I, z ludzkimi rybosomalnymi białkami P1 i P2 w różnych układach doświadczalnych. Analizowała również wpływ fosforylacji C-terminalnych fragmentów białek P na ich interakcję z ww. toksynami.

Toksyny RIP posiadają aktywność *N*-glikozydazową; wiążą się do centrum GTPazowego rybosomu poprzez białka P, a następnie poprzez depurynację adeniny (A4324 w rRNA szczura) w pętli sarcynowo-rycinowej (SRL) powodując uszkodzenie pętli, co ma dramatyczne konsekwencje dla wiązania i aktywności trGTPaz, a tym samym działania rybosomu. Pomimo, że rola białek RIP jako *N*-glikozydaz uszkadzających pętlę SRL została dobrze udokumentowana, jednak ciągle wiele aspektów wiązania się toksyn do rybosomu, uszkadzania centrum GTPazowego oraz mechanizmu indukowania przez ww. toksyny śmierci komórki nie zostało wyjaśnionych. Mechanizm działania białek RIP jest bardzo intensywnie badany w wielu laboratoriach na świecie ze względu na olbrzymią toksyczność tych białek, jak również możliwość wykorzystania niektórych z nich w medycynie. Praca doktorska Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał wpisuje się świetnie w nurt tych bardzo cennych badań.

Rozprawę doktorską Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał stanowi cykl trzech wieloautorskich prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych. Dwie z nich to oryginalne prace eksperymentalne (opublikowane w *Scientific Reports* oraz *FEBS Letters*), natomiast jedna praca to praca przeglądowa opublikowana w *Toxins (Basel)*. Wszystkie prace są spójne tematycznie - dotyczą mechanizmu działania toksyn inaktywujących rybosom, a w szczególności ich oddziaływania z C-terminalnymi fragmentami białek P.

Rozprawa doktorska oprócz wspomnianych prac zawiera:

- Streszczenie w języku polskim i angielskim;
- Wstęp, który razem z publikacją przeglądową świetnie wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy;
- Cel i uzasadnienie tematyki podjętej pracy - jasno opisujące założenia i zasadność prowadzonych badań;
- Materiały i Metody - rozdział, w którym znajduje się dokładny opis metod wykorzystywanych przez Doktorantkę w badaniach, których wyniki przedstawione zostały w wybranych publikacjach;
- Krótki opis publikacji wchodzących w skład rozprawy;
- Podsumowanie i wnioski;



- Spis literatury.

Załączone oświadczenia Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał oraz współautorów publikacji stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej nie budzą wątpliwości, że Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał miała istotny wkład w ich powstanie. Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał brała udział w opracowaniu koncepcji eksperymentów, wykonała wiele doświadczeń opisanych w pracach eksperymentalnych, brała udział w analizie ich wyników, pisaniu manuskryptów oraz przygotowywaniu figur. Należy podkreślić, że w jednej z prac eksperymentalnych Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał jest pierwszym autorem i oczywiście wkład Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał w powstanie tej publikacji jest zdecydowanie największy.

Badania opisane w pierwszej z załączonych prac - Grela P., Li X.-P., Horbowicz P., Dźwierzyńska M., Tchórzewski M., Tumer N.E. (2017) „Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus” opublikowanej w *Scientific Reports* (7(1):5608 - miały na celu poznanie mechanizmu interakcji podjednostki katalitycznej rycyny (RTA) z ludzkim rybosomalnym centrum GTPazowym, ze szczególnym uwzględnieniem roli każdego z białek P (P1 i P2) w tym oddziaływaniu. Wykazano, że RTA wiąże się preferencyjnie do heterodimeru ludzkich białek P1-P2 (najmniejszej jednostki funkcjonalnej bocznej wyniosłości rybosomu), lecz białka te nie wiążą równo-cennie toksyny. Wyniki analiz oddziaływań RTA z dimerami białek P1 i P2 w różnych kombinacjach (w tym, z delecją lub bez delecji C-końcowych fragmentów białka P1 albo P2) jednoznacznie wykazały, że stechiometria interakcji dimerów P1-P2 z RTA jest 1:1 oraz, że zdecydowanie większe powinowactwo do RTA mają białka P1 niż białka P2, pomimo identycznych ich C-końcowych fragmentów. Wynik ten oznaczał, że w interakcję białek P z RTA, oprócz C-terminalnych fragmentów białek P, zaangażowane są również inne elementy białek P, które wpływają najprawdopodobniej na konformację dimeru P1-P2.

Kinetykę wiązania RTA do białek P1 i P2 badano nie tylko w układzie dimerów, lecz również pentamerów. Analizowano interakcję RTA z pentamerycznym kompleksem białek P, odzwierciedlającym boczną wyniosłość rybosomalną uL10(P1-P2)₂ człowieka; jest układ zdecydowanie bliższy temu co ma miejsce w naturze. Układ doświadczalny był analogiczny jak w przypadku dimerów białek P; czyli badano kinetyczne parametry oddziaływania pentamerycznego kompleksu pozbawionego (lub nie) C-terminalnych fragmentów białek P1 albo P2. Należy zaznaczyć, że tę część badań realizowała Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał. To nie było trywialne zadanie. Uzyskane wyniki wykazały, że (1) pentamer ma zdecydowanie większe powinowactwo do RTA niż dimer, (2) cechuje się bardzo dużą dynamiką wiązania RTA - bardzo szybką asocjacją, jak również bardzo szybką dysocjacją RTA. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły różną funkcję białek P1 i P2 w wiązaniu toksyny wykazaną w badaniach dimerów.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano prawdopodobny mechanizm interakcji toksyny z rybosomalnym centrum GTPazowym.

Badania, których wyniki zostały zawarte w drugiej pracy eksperymentalnej (Horbowicz-Drożdżał P, Kamel K, Kmiecik S, Borkiewicz L, Tumer NE, Shaw PC, Tchórzewski M, Grela P. „Phosphorylation of the conserved C-terminal domain of ribosomal P-proteins impairs the mode of interaction with plant toxins. *FEBS Lett.* 2021 Sep;595(17):2221-2236) miały na celu zbadanie wpływu fosforylacji dwóch reszt serynowych w konserwowanych C-terminalnych fragmentach ludzkich rybosomalnych białek P1 i P2 na oddziaływanie z toksynami (RTA i TCS). Fosforylacja ta jest katalizowana przez kinazę CK2. Uzyskane wyniki parametrów kinetycznych oddziaływań toksyn z dimerami białek P1-P2, w których reszty, które mogą być fosforylowane zostały zastąpione (lub nie) kwasem glutaminowym, który funkcjonalnie może zastępować ufosforylowaną resztę seryny/treoniny albo alaninę, która nie może być fosforylowana, wykazały, że fosforylacja zaburza badane oddziaływanie. Obserwowano znacząco niższe powinowactwo dimeru P1-P2 z mutacją S/E do badanych toksyn niż dimeru z mutacją S/A lub dimeru niezmutowanego. Fosforylacja powoduje destabilizację kompleksu na skutek indukcji zmian konformacyjnych białek P czego wynikiem jest szybsza dysocjacja RTA/TCS.



Bardzo wysoko oceniam uzyskane wyniki. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowoczesnych metod biofizycznych do analizy powstających kompleksów i kinetyki oddziaływania toksyn RIP z kompleksami białek P oraz staranność przygotowania materiału badawczego i wykonania zaplanowanych doświadczeń. Przy użyciu kilku niezależnych metod badane były własności biofizyczne białek, które były następnie używane do analiz parametrów kinetycznych oddziaływań, aby mieć pewność, że analizowane białka są prawidłowe (mają prawidłową masę cząsteczkową i strukturę), a ich czystość zapewnia uzyskanie wiarygodnych wyników. Oddziaływania i ich kinetyka monitorowane były przy wykorzystaniu kilku niezależnych nowoczesnych technik badawczych.

Wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, co jest gwarantem wysokiej jakości wykonanych badań. Nie mam najmniejszych zastrzeżeń dotyczących strony merytorycznej rozprawy. Chciałabym podkreślić również staranność z jaką Pani mgr Patrycja Horbowicz-Drożdżał przygotowała rozprawę. Nie mam uwag do strony edytorskiej rozprawy, może jedną bardzo małą: na Rys. 3 zabrakło kolorów, choć w legendzie tego rysunku są one opisane.

Mam natomiast kilka pytań, które nasunęły mi się w trakcie czytania rozprawy.

1. Zaciekało mnie uzyskanie pentamerów białkowych $\Delta uL10(P1-P2)_2$, $\Delta uL10(P1\Delta C-P2)_2$, $\Delta uL10(P1-P2\Delta C)_2$. Wykorzystano w tym celu tricistronową kasetę ekspresyjną stworzoną na bazie wektora PGEXT1, co umożliwiło utworzenie pentamerów *in vivo* w *E. coli*. Jest to oczywiście bardzo wygodna i szybka metoda, stosowana już wcześniej w laboratorium kierowanym przez Prof. Marka Tchórzewskiego. Chciałabym jednak się zapytać, czy jest możliwe utworzenie prawidłowych pentamerów *in vitro* poprzez zmieszanie oczyszczonych białek, a następnie wyizolowanie pentamerów za pomocą chromatografii powinowactwa, tak jak w przypadku oczyszczania pentamerów utworzonych *in vivo* w *E. coli*?
2. W badaniach oddziaływań pentamerów z RTA białko uL10 pozbawione było N-fragmentu oddziałującego z RNA oraz C-terminalnego fragmentu, który wspólnie z białkami P uczestniczy w wiązaniu toksyn. Fragmenty te usunięto, aby określić rolę C-terminalnych zakonserwowanych fragmentów białek P w tym procesie. Czy próby, w których w pentamerze białko uL10 pozbawione byłoby tylko N-terminalnego fragmentu były robione?
3. Różnice w wiązaniu RTA do pentamerów $uL10(P1\Delta C-P2)_2$, $uL10(P1-P2\Delta C)_2$ nie były tak znaczące jak w przypadku dimerów pozbawionych C-końcowych aminokwasów odpowiednio w P1 lub P2. Czym to można wytłumaczyć?
4. Wyniki badań dotyczących roli fosforylacji białek P1 i P2 w wiązaniu toksyn są w pełni przekonujące. Nie mam wątpliwości, że fosforylacja obniża powinowactwo dimerów P1-P2 do RTA i TSC, wymusza zmiany strukturalne i szybszą dysocjację toksyn. Badając rolę fosforylacji białek P1/P2 ograniczono się do badania heterodimerów, nie badano pentamerów z wprowadzonymi mutacjami - substytucjami S na A lub na E. Czy powodem były trudności w uzyskaniu pentamerów z wprowadzonymi mutacjami?
5. Pentamer $uL10(P1-P2)_2$ oddziałuje nie tylko z badanymi toksynami RIP, lecz również, a raczej przede wszystkim, z trGTPazami. Ponadto C-końcowe fragmenty białek P zaangażowane są w oddziaływanie z ATPazą ABCE1 oraz w aktywację kinazy GCN2. Wyniki opisane w publikacji składającej się na rozprawę doktorską jednoznacznie wskazują, że fosforylacja C-terminalnych fragmentów białek P1 i P2 przez kinazę CK2 ma znaczący wpływ na kinetykę wiązania toksyny. A czy wiadomo jaki jest/może być wpływ tej fosforylacji na wiązanie trGTPaz, ABCE1 lub na aktywność GCN2? A tym samym czy fosforylacja C-końcowych fragmentów białek P może regulować wydajność/szybkość translacji? Czy były prowadzone takie badania? Czy można wysnuć wnioski na ten temat np. wykorzystując dokowanie molekularne?



6. Rozważając zmiany stopnia ufosforylowania C-końcowych fragmentów białek P1 i P2 *in vivo*, czy nie można wykluczyć, że kinaza inna niż CK2 może fosforylować C-końcowe fragmenty białek P, np. w warunkach stresu?
7. Wiele białek RIP jest pochodzenia roślinnego? Jaka jest ich rola w roślinie? Czy jest to może obrona przed patogenami?
8. We Wstępie znajduje się informacja, że poza białkami P1/P2 związanymi z rybosomem istnieje też cytoplazmatyczna pula tych białek. Czy już wiadomo jaka jest ich funkcja?

Pytania moje wynikają jedynie z ciekawości, nie mają najmniejszego wpływu na moją wysoką ocenę pracy.

Na końcu mojej recenzji chciałabym wspomnieć o życiorysie naukowym Doktorantki zamieszczonym na ostatnich stronach rozprawy – jest imponujący. Życiorys naukowy oraz wyniki uzyskane przez Panią mgr Patrycję Horbowicz-Drożdżał wskazują na jej aktywność i dojrzałość naukową oraz zaangażowanie w popularyzację badań naukowych.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych i wnoszę do Rady Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką wartość naukową wyników opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach naukowych wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Grażyna Dobrowolska