



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

14 czerwca 2022, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Patrycji Horbowicz-Drożdzał z tytułowanej

„Charakterystyka funkcjonalna C-terminalnych fragmentów ludzkich białek P w oddziaływaniu z białkami inaktywującymi rybosom”

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdzał została wykonana pod opieką promotora Pana prof. dr hab. Marka Tchórzewskiego oraz promotora pomocniczego Pana dr Przemysława Greli w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Celem rozprawy doktorskiej jest wyjaśnienie znaczenia fosforylacji białek P rybosomu dla ich oddziaływań z toksynami roślinnymi. Toksyny te są enzymami, które hydrolizują wiązanie glikozydowe pomiędzy adeniną a rybozą w obrębie pętli sarcynowo-rycynowej w rybosomowym RNA, prowadząc do depurynacji tej pozycji. Białka P tworzą część wyniosłości bocznej rybosomu i wraz z pętlą sarcynowo-rycynową w rybosomowym RNA uczestniczą w wiązaniu i aktywacji GTPaz, które są ważnymi białkami uczestniczącymi w translacji. Dla funkcji tych GTPaz niezbędna jest zmiana konformacyjna indukowana hydrolizą GTP. W ramach fascynującej adaptacji ewolucyjnej niektóre toksyny występujące u roślin i bakterii korzystają z białek P jako miejsca wiązania, które pozwala im się ulokować w taki sposób, aby móc uszkodzić rRNA w pętli sarcynowo-rycynowej. W ten sposób uniemożliwiają aktywację GTPaz i zatrzymują translację. Ponieważ białka P podlegają modyfikacji potranslacyjnej polegającej na fosforylacji reszt serynowych w obrębie regionu wiążanego przez toksyny, Doktorantka w swojej pracy podjęła się rozwiązania bardzo ważnego zagadnienia, którym jest poznanie roli tych reszt fosforanowych w wiązaniu toksyn uszkadzających pętlę sarcynowo-rycynową.

Na rozprawę doktorską składają się trzy publikacje, dwie eksperymentalne i jedna przeglądowa, opublikowane w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach naukowych. W publikacji eksperymentalnej w czasopiśmie *FEBS Letters* Doktorantka



jest pierwszą Autorką, a w publikacji eksperymentalnej w czasopiśmie *Scientific Reports* oraz przeglądowej w czasopiśmie *Toxins* jest trzecią Autorką. Cele badawcze tych publikacji dotyczą powiązanych aspektów dotyczących charakterystyki oddziaływań toksyn z ludzkimi białkami P, które są zgodne z tematyką pracy doktorskiej. Udział współautorów publikacji jest precyzyjnie określony w zawartych oświadczeniach.

Bardzo pomocną częścią rozprawy świadczą o świetnym zorientowaniu się Doktorantki w dziedzinie swoich badań naukowych jest wstęp literaturowy wraz z omówieniem celów rozprawy, najważniejszych osiągnięć zawartych w niej publikacji, oraz metodyki badań. W tej części pracy Doktorantka omówiła najistotniejsze cechy budowy i działania centrum GTPazowego na tle mechanizmu translacji. Ponadto przedstawiła różnorodność funkcjonalną, strukturalną i filogenetyczną toksyn RIP - enzymów uszkadzających pętlę sarcynowo-rycynową. Objaśniła także te aspekty struktury i funkcji białek P i oddziałujących z nimi toksyn, które są kluczowe dla zrozumienia mechanizmu ich oddziaływania ze sobą oraz wynikających z tego skutków funkcjonalnych. Ponadto przedstawiła metody, które stosowała w swoich badaniach, szczególnie dotyczące otrzymywania kompleksów badanych białek, a także służące do zmierzenia stabilności termodynamicznej i kinetyki oddziaływań białek P z roślinnymi toksynami RIP. Wraz z wyjaśnieniem najważniejszych osiągnięć przedstawionych w publikacjach składających się na rozprawę doktorską, wstęp ten jest niezwykle cennym wprowadzeniem do tematyki pracy. Należy podkreślić, że napisany jest językiem bardzo przejrzystym i logicznym oraz odpowiednio ilustrowany w sposób ułatwiający zrozumienie złożonych zagadnień mechanistycznych.

W pierwszej z prac wchodzących w skład rozprawy, opublikowanej w *Scientific Reports*, Doktorantka jest trzecią Współautorką. W pracy tej zbadano znaczenie szesnastoaminokwasowych C-końcowych fragmentów białek P1 i P2 dla wiązania łańcucha A rycyny. Rolę tych regionów zbadano w dwóch kontekstach: pierwszym z nich były dimery P1/P2, a drugim pełne pentameryczne kompleksy złożone z białka uL10 oraz zakotwiczonych w nim dwóch dimerów P1/P2. W tej pracy Doktorantka wykonała badania dotyczące roli fragmentów C-końcowych w kontekście kompleksów pentamerycznych. W tym celu przeprowadziła złożoną procedurę równoczesnej nadekspresji składników kompleksu i oczyszczania pentameru po jego uformowaniu w komórkach *E. coli*, oraz potwierdzenia jego prawidłowego składu i homogenności. Pomiary wiązania łańcucha A rycyny do pentameru zawierającego pełnej długości białka



P1 i P2 albo ich mutanty z delecją regionu C-końcowego zbadana przy pomocy interferometrii biowarstwowej, która to metoda pozwala na obliczenie wartości stałej równowagi reakcji wiązania ze zmierzonych parametrów kinetyki asocjacji i dysocjacji kompleksu. Wyniki Jej badań pozwoliły na ustalenie, że kluczowe znaczenie dla oddziaływania rycyny z pentamerem ma obecność regionu C-końcowego w łańcuchu P1, podczas gdy odpowiadający mu region w białku P2 ma mniejsze znaczenie. Wyniki te są zgodne z otrzymanymi w pierwszej linii badawczej tej publikacji, która polegała na badaniu wiązania do izolowanych dimerów P1/P2.

W odniesieniu do tej części rozprawy chciałbym poprosić Doktorantkę o odniesienie się do dwóch kwestii. (1) Z czego wynika fakt, że region C-końcowy białka P1 jest znacznie ważniejszy dla wiązania rycyny niż odpowiadający mu region białka P2? Czy wynika to z różnic w sekwencji tych białek, czy może z geometrii kompleksu P1/P2? (2) Jaka jest funkcja białka P2 w kompleksie P1/P2 podczas w translacji, czy jest odmienna od funkcji P1? Czy homodimer P1/P1 może funkcjonalnie zastąpić heterodimer w translacji oraz jako miejsce wiązania rycyny?

W drugiej publikacji eksperymentalnej wchodzącej w skład rozprawy, wydanej w czasopiśmie *FEBS Letters*, Doktorantka jest pierwszą Autorką. Doktorantka otrzymała i oczyściła kompleksy pentameryczne zawierające badane białka P1 i P2 oraz ich mutanty oraz zbadala oddziaływania pomiędzy nimi metodami interferometrii biowarstwowej oraz termoforezy mikroskalowej. Celem tego projektu było sprawdzenie, czy fosforylacja dwóch reszt seryny znajdujących się regionach C-końcowych białek P1 i P2 zmienia wiązanie toksyn rycyny oraz trichosantyny do kompleksu pentamerycznego. Wymienione reszty seryny znajdują się w obrębie sekwencji bogatej w reszty naładowanych ujemnie aminokwasów kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego, która sąsiaduje z miejscem wiązania obu toksyn w regionie C-końcowym. Aby zbadać znacznie fosforylacji tych reszt seryny dla wiązania toksyn Doktorantka zaprojektowała mutanty białek P1 i P2, w których obie te seryny każdego z białek były zastąpione albo resztami alaniny, które są izosteryczne względem seryn, albo resztami kwasu glutaminowego, które są uważane jako reszty fosfomimetyczne, czyli posiadające podobną rolę dla struktury białka jak fosforylowana seryna. Badaniom poddano kompleksy, w których w obu białkach obie reszty seryny były zamienione na odpowiednie reszty aminokwasowe. Wyniki badań wskazały, że zamiana reszt seryny w regionie C-końcowym białek P1/P2 na alaniny nie zmieniła stabilności ani kinetyki



wiązania obu toksyn. Natomiast zamiana obu reszt seryny na reszty kwasu glutaminowego osłabiła wiązanie obu toksyn. Osłabienie stabilności termodynamicznej wiązania wynikało z szybszej kinetyki dysocjacji toksyn od kompleksu pentamerycznego względem kompleksu z białkami P1/P2 bez mutacji. Szybkość asocjacji natomiast pozostała niezmienną. Informuje nas to o tym, że mutacje nie spowodowały dodatkowej bariery energetycznej dla utworzenia kompleksu, natomiast spowodowały zerwanie lub osłabienie pewnej części oddziaływań stabilizujących już utworzony kompleks. Badania modelowania komputerowego, przeprowadzone przez innego ze współautorów sugerują, że przyczyną zmian może być utworzenie alternatywnej struktury przestrzennej fragmentu białka obejmującego region wiązania obu toksyn. Wskazuje to, że mutacja fosfomimetyczna w miejscu reszt serynowych osłabia wiązanie do obu toksyn poprzez zmianę struktury ich miejsca wiązania, a nie poprzez bezpośrednią interferencję wprowadzonej reszty fosfomimetycznej w oddziaływanie pomiędzy toksyną a kompleksem P1/P2.

Również w odniesieniu do tej części rozprawy chciałbym poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie dwóch kwestii. (1) Zaskakującą obserwacją jest to, że tak dramatyczny efekt na wiązanie rycyny wynika z wprowadzenia zaledwie dwóch dodatkowych reszt o ładunku ujemnym w sekwencji 9-aminokwasowej (EESEESDDD), która zawiera już 7 aminokwasów o ładunku ujemnym, co oznacza, że względna zmiana ładunku ujemnego w tej sekwencji nie jest aż tak duża. Czy mógłbym poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie możliwych hipotez tłumaczących tą obserwację? (2) Ponieważ badania nad rolą fosforylacji dla wiązania zostały wykonane dla kompleksu, w którym białka P1 i P2 miały takie same mutacje, nie jest możliwe rozróżnienie efektów zależnych od P1 i od P2. Czy zdaniem Doktorantki, w oparciu o Jej wcześniejsze badania, możemy się spodziewać, że wprowadzenie mutacji fosfomimetycznych do białka P1 byłoby wystarczające dla uzyskania równie silnego negatywnego skutku dla wiązania jak w badanym przez Nią kompleksie, w którym oba białka były zmutowane?

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca doktorska imponuje precyzyjną analizą mechanizmu obserwowanych zmian w wiązaniu toksyn RIP zależnie od mutacji wprowadzonych w regionach C-końcowych. Doktorantka wyjaśniła ważne aspekty mechanizmu powodującego, że toksyny RIP poprzez oddziaływanie z białkami P mogą prowadzić do precyzyjnego uszkodzenia rybosomu, a także zaproponowała mechanizm



mogący służyć do zablokowania miejsca wiązania tych toksyn poprzez fosforylację reszt aminokwasowych w jego sąsiedztwie. Uzyskanie wyników tak precyzyjnie wyjaśniających ważne aspekty molekularne tych mechanizmów było możliwe dzięki zastosowaniu przez Doktorantkę zaawansowanych metod biofizycznych pozwalających na rozróżnienie parametrów kinetycznych i termodynamicznych wiązania. Zastosowanie w badaniach zawartych w rozprawie doktorskiej zarówno warsztatu biologii molekularnej jak i biofizyki jest jednym z ważnych atutów tej pracy.

Praca Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o nadanie Pani mgr Patrycji Horbowicz-Drożdżał stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto ze względu na dużą wartość naukową uzyskanych wyników wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych UMCS o wyróżnienie tej pracy doktorskiej. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam w szczególności wyjaśnieniem przez Doktorantkę na poziomie molekularnym kluczowych cech mechanizmu wiązania toksyn RIP z białkami kompleksu pentamerycznego zawierającego białka P1/P2, w tym roli fosforylacji białek P dla wiązania toksyn. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę pozwoliły na wyjaśnienie jaki sposób działania toksyn RIP zostało zoptymalizowane w ewolucji, po to aby zatrzymać translację poprzez wprowadzenie drobnego uszkodzenia w precyzyjnie wybranym miejscu rybosomu.

Mikołaj Olejniczak