



Lublin, 2022-07-03

Recenzja pracy doktorskiej mgr Moniki Dźwierzynskiej pt. „Interakcja ludzkich rybosomalnych białek P z katalityczną podjednostką rycyny”.

Bez wątpienia jednym z największych osiągnięć nauk biologicznych przełomu XX i XXI wieku było określenie struktury cząsteczkowej rybosomów a jednocześnie zrozumienie molekularnego mechanizmu procesu translacji – przekodowania sekwencji mRNA na sekwencję aminokwasową białka będącego „produktem” danego genu. Ten olbrzymi postęp dokonał się dzięki skonsolidowanym wysiłkom naukowców z wielu krajów i instytucji a jego randze świadczy fakt, że trójka z nich, Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz i Ada E. Yonath została w roku 2009 uhonorowana Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Rybosom, centralny element maszynery translacyjnej to ogromny, wieloskładnikowy kompleks rybozomo-proteinowy, który w wyniku interakcji z partnerującymi makrocząsteczkami dokonuje sekwencyjnego dekodowania informacji zawartej w trójkach nukleotydowych polimeru mRNA i skoordynowaną z tym syntezę wiązań peptydowych kolejnych aminokwasów określonej sekwencji. Oprócz centrum dekodującego zlokalizowanego na mniejszej podjednostce rybosomalnej oraz centrum peptydylotransferazy występującego na dużej podjednostce, bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu rybosomu odgrywa centrum GTPazowe zlokalizowane na dużej podjednostce a postrzegane jako główny element zasilający maszynę translacyjną w energię i zapewniający kierunkową kinetykę procesu translacji (elongację). Eukariotyczne centrum GTPazowe zawiera w swojej strukturze charakterystyczny „kciuk”, strukturę zbudowaną m.in. z rybosomalnego białka ul.10 oraz unikalnych dla eukariontów białek P1/P2. Pentameryczny kompleks ul.10(P1-P2)₂, jako kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania rybosomu jest celem molekularnym szeregu toksyn z grupy *Ribosomal Inactivating Proteins* (RIP). W tym białka rycyny pochodzącej z rącznika pospolitego, jednej z najniebezpieczniejszych toksyn, której podjednostka katalityczna przyłącza się do centrum GTPazowego i katalizuje reakcję usuwania adeniny ze znajdującej się w pobliżu pętli sarcynowo-rycynowej rybosomalnego RNA, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania funkcji całego kompleksu rybosomu na etapie cyklu elongacyjnego.

Celem badawczym pracy doktorskiej mgr Dźwierzynskiej było określenie roli białek P, oraz roli ich wysoce konserwatywnych fragmentów C-terminalnych w interakcjach z białkiem z grupy RIP, rycyną. Istotą pracy było otrzymanie rekombinowanych białek P1, P2 oraz katalitycznej podjednostki rycyny wykorzystując heterologiczny układ ekspresji oraz



wykorzystanie metod bioanalitycznych do scharakteryzowania tych rekombinowanych struktur a następnie analiza powinowactwa i interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny. Wśród celów szczegółowych znalazło się określenie roli w tych oddziaływaniach konserwatywnego fragmentu C-końcowego białek P, co zrealizowano poprzez konstrukty genetyczne pozwalających na otrzymanie tzw. delecyjnych form tych białek, z których usunięto 16 ostatnich aminokwasów. Doktorantka prawidłowo zaplanowała i szczegółowo opisała zastosowane metody badawcze: przygotowanie konstruktów genetycznych, ich heterologiczną ekspresję w *Escherichia coli*, metody oczyszczanie oraz charakterystykę biochemiczną i biofizyczną metodami chromatografii SEC, dichroizmu kołowego, skaningowej fluorymetrii nano-różnicowej oraz spektrometrii mas; sama analiza interakcji dimerów białek P1-P2 (oraz ich form delecyjnych) z katalityczną podjednostką rycyny została zrealizowana za pomocą termoforezy mikroskalowej oraz interferometrii bio-warstwowej. W toku badań wyznaczono wartości stałych dysocjacji kompleksów P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny; wykazano, że C-terminalne regiony tych białek pełnią kluczową rolę w tworzeniu tych interakcji, z zauważalną dominacją fragment C-końcowego białka P1. Wyniki sugerują, że nie tylko same fragmenty C-terminalne ale także globalna organizacja przestrzenna heterodimeru P1-P2 eksponującego C-końcowy fragment białka P1 zapewnia właściwą orientację promującą interakcje z białkami klasy RIP. Wyniki mają istotne znaczenie dla zrozumienia opisywanych procesów a znacząca część rezultatów oraz podstawowe wnioski przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej zostały opublikowane w artykule naukowym „*Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus*” opublikowanym w 2017 roku w *Scientific Reports*; doktorantka jest jednym ze współautorów tej publikacji.

Praca doktorska ma klasyczny układ. Całość rozpoczyna się od teoretycznej części wstępnej, w której autorka opisuje topologię małej i dużej podjednostki rybosomu, strukturę centrów aktywnych odpowiadających za: (i) dekodowanie mRNA, (ii) peptydylotransferazę i (iii) GTPazową elongację, szczegóły strukturalne białek P oraz białka rycyny. Po czym następuje sformułowanie celu pracy, bardzo szczegółowym opisaniem materiałów i zastosowanych różnorodnych metod eksperymentalnych a następnie omówienie wyników i ich dyskusja. Całość pracy zamyka streszczenie w języku angielskim oraz bibliografia składająca się z 227 odnośników literaturowych, z których 156 (69%) to pozycje opublikowane w XXI wieku. Na podkreślenie zasługuje fakt, bardzo obszernego (i w mojej opinii miejscami zbyt szczegółowego) ilustrowania przedstawianych treści przy pomocy modeli molekularnych kompleksów poszczególnych podjednostek rybosomalnych, miejsc aktywnych, oddziaływań międzymolekularnych, które uzyskano w badaniach biologii strukturalnej składników układu rybosomu. W mojej opinii część wstępna pracy doktorskiej zyskałaby na przejrzystości, gdyby doktorantka zdecydowała się na umieszczenie jednej bardziej popularnonaukowej ilustracji schematycznie przedstawiającej podjednostki rybosomu oraz ogólny kinetyczny mechanizm procesu translacji realizowanego przez ten kompleks.



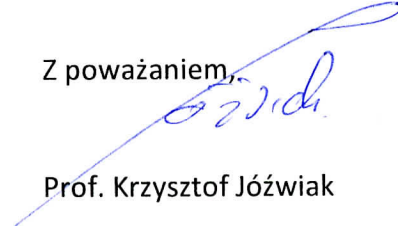
W tak obszernej pracy oczywiście nie udało się uniknąć pewnych błędów czy niejasności, z obowiązku recenzenta chcę wspomnieć o kilku takich przypadkach. (i) W streszczeniu na str. 10 pojawia się błędne przetłumaczenie metody *size exclusion chromatography* jako „chromatografia jonowymienna” – jestem właściwie pewien, że błąd ten mógł wynikać z pośpiechu przygotowania abstraktu na końcowych etapach redakcji pracy doktorskiej: Autorka w głównym tekście pracy doktorskiej już prawidłowo opisuje SEC jako „sita molekularne”, „filtrację żelową” itp. (np. str 64). (ii) Na stronie 23 pojawia się chyba niefortunne przetłumaczenie pojęcia „*harpin loop*” jako „szpilki do włosów”, podczas gdy ten często występujący w biologii strukturalnej motyw (nić polipetydu gwałtownie zawracająca o 180 stopni) powinien być raczej przetłumaczony na polski jako „wsuwka do włosów”. (iii) Na dole strony 42 doktorantka do opisu sieci oddziaływań pomiędzy składnikami kompleksu $\alpha P1(CDT)-\alpha EF1\alpha-GDP/GTP$ używa sformułowania „wiązania hydrofobowego”, które w świetle definicji IUPAC pojęć lipofiliwość i hydrofobowość jest nieprawidłowe. W skrócie, hydrofobowość to zjawisko, które obserwujemy w polarnym środowisku wodnym, gdy niepolarne cząsteczki lub ich fragmenty wykazują tendencje do agregacji wynikającą ze spontanicznego dążenia do ukrycia niepolarnych powierzchni przed kontaktem z cząsteczkami wody [E. Rutkowska, K. Pająk, K. Józwiak, *Lipophilicity – methods of determination and its role in medicinal chemistry*, Acta Polonia Pharmaceutica, 2013; 70(1), 3-18]. Termodynamicznie, ta entropowo indukowana tendencja nie ma charakteru „wiązania” rozumianego jako przyciąganie dwu partnerów; nie istnieje gdy np. środowisko wodne zostanie zamienione na próżnię. W opisywanym przypadku doktorantka powinna użyć bardziej precyzyjnego pojęcia „interakcji/oddziaływań hydrofobowych” względnie wiązań o charakterze niepolarnym. (iv) W sekcji opisującej spektrometrię mas autorka stwierdza, że jest to metoda analityczna, która „pozwala obliczyć masę z dokładnością do pojedynczych atomów” (str. 67). Wypada mi się z tym nie zgodzić: współczesne aparaty pozwalają mierzyć stosunek m/z z dokładnością/rozdzielczością przekraczającą 10^{-5} jednostki masy atomowej. (v) W kilku przypadkach zauważyłem nieprawidłowe lub niekompletne formatowanie opisów odnośników literaturowych; są to pozycje 22, 43, 191, 205. Wszystkie te omówione wyżej przypadki nie stanowią jednak poważnych uchybień i nie wpływają na pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

W podsumowaniu, pozytywnie oceniam wartość merytoryczną i naukową pracy doktorskiej mgr Moniki Dźwierzynskiej, jak również ogólną wiedzę Kandydatki w obszarze biologii maszynierii translacyjnej. W opinii recenzenta praca doktorska pt. **„Interakcja ludzkich rybosomalnych białek P z katalityczną podjednostką rycyny”** jest przejrzyste przedstawiona, prawidłowo zaprojektowana i udokumentowana, a dotyczy ważnego zagadnienia strukturalnych oddziaływań pomiędzy miejscem GTPazowym eukariotycznego rybosomu a znanymi toksynami klasy RIP. Tym samym spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim przez stosowne akty prawne oraz normy zwyczajowe środowiska naukowego. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu



Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Moniki Dźwierzyskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,


Prof. Krzysztof Józwiak