



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Analitycznej

Dr hab. Benedykt Władyka, prof. UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Andrzeja Dubiela pt.  
„Proteaza ClpAP jako czynnik kontrolujący aktywację systemu  
toksyna-antytoksyna *parDE* plazmidu RK2”**

Praca doktorska Pana mgr. inż. Andrzeja Dubiela została wykonana w Pracowni Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Igora Koniecznego i dr Katarzyny Węgrzyn. Rozprawa dotyczy badań nad rolą proteazy ClpAP w aktywacji systemu toksyna-antytoksyna *parDE* kodowanym w plazmidzie RK2. Duża część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie została już opublikowana w 2018 roku w czasopiśmie Scientific Reports, w artykule którego pierwszym autorem jest Pan Andrzej Dubiel.

Systemy toksyna-antytoksyna (TA) są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii, nie występują co ciekawe u organizmów wyższych. Generalnie składają się z elementu wywołującego efekt toksyczny u gospodarza oraz antytoksyny, która hamuje produkcję lub działanie toksyny. Różnorodność systemów TA zarówno pod względem budowy jak i molekularnych mechanizmów działania sprawia, że są one przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Ponieważ systemy TA są kodowane zarówno na ruchomych elementach genetycznych (MGE) jak i w chromosomie bakteryjnym ich pierwotnie postulowana rola jako „bezlitośni eliminatory” komórek pozbawionych materiału genetycznego ich kodującego musiała zostać zmodyfikowana. Otworzyło to nowy front badań nad rolą systemów TA w fizjologii bakterii i mechanizmami ich aktywacji oraz dezaktywacji. Ponadto udowodniona wielokrotnie rola systemów TA w stabilizacji plazmidów w populacji bakteryjnej oraz powiązanie tego faktu z horyzontalnym transferem MGE w kontekście rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki wśród bakterii nadaje tym badaniom dodatkowe aspekty praktycznej zastosowalności. Praca doktorska Pana A. Dubiela opisująca mechanizm aktywacji systemu *parDE* kodowanym na plazmidzie warunkującym oporność na trzy antybiotyki niewątpliwie wpisuje się w nurt takich badań.

Licząca 90 stron praca doktorska ma układ klasyczny, składający się ze spisu treści, wykazu skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, wyników oraz dyskusji. Pracę kończy zbiór tabel i spis literatury zawierający 175 pozycji.

We wstępie Doktorant definiuje czym są systemy TA przedstawiając ich klasyfikację i funkcje komórkowe. W oparciu o niezbyt fortunnie zacytowaną pracę (Karłowicz i wsp, 2016, której Pan A. Dubiel jest współautorem) wyróżniono 6 typów systemów TA. Choć jest to liczba ciągle podawana w wielu opracowaniach dotyczących systemów TA, to aktualnie systemy te klasyfikuje się w 8 typów (Song i Wood, 2020, *Advanced Biosystems* 1900290). Funkcje komórkowe systemów TA są ciągle przedmiotem badań i sporów wśród badaczy, co znajduje odzwierciedlenie w szerokim wachlarzu roli systemów TA przedstawionym we wstępie. Wśród funkcji opisanych szerzej znalazła się posegregacyjna śmierć komórki (PSK), odpowiedź na infekcję fagową i formowanie komórek spoczynkowych. Należy jednak zwrócić uwagę, że rola systemów TA w wyżej wymienionych mechanizmach jest też wyraźnie kwestionowana przez niektórych badaczy (Song i Wood, 2018 *Frontiers in Microbiology* 9:814), a nawet niektóre doniesienia (cytowane w niniejszej pracy) opublikowane w tak prestiżowych czasopismach jak PNAS i Cell zostały wycofane (Maisonneuve i wsp., 2011 i 2014). Brak wzmianki o tych faktach uchybia nieco temu, w ogólnej ocenie bardzo wyczerpującemu i opartemu na wielu doniesieniach literaturowych opracowaniu. Na uwagę zasługuje szczegółowe przedstawienie mechanizmów aktywacji systemów TA, wśród których znajduje się proteolityczna degradacja antytoksyny. Jest to wraz z charakterystyką systemu *parDE* plazmidu RK2 bardzo dobre wprowadzenie do przedstawienia wyników własnych badań.

Cele pracy przedstawione są raczej w formie szczegółowych zadań badawczych. W mojej ocenie zabrakło tu przedstawienia szerszego kontekstu prowadzonych prac, w tym hipotezy badawczej, oraz uzasadnienia wyboru przedmiotu badań, systemu *parDE* z plazmidu RK2.

Rozdział „Materiały i Metody” (24 strony) jest obszerny. Jego rozmiary w przeważającej większości nie wynikają jednak ze zbędnej rozwlekłości opisów ale z dużej ilości używanych materiałów (kilkunastu rekombinowanych szczepów bakterii oraz podobnej liczby konstruktyw plazmidowych wykorzystywanych między innymi do produkcji białek rekombinowanych) oraz szerokiego wachlarza metod zastosowanych w niniejszej pracy. Świadczy to o kompleksowym podejściu Doktoranta do badań i umiejętności zastosowania wielu technik, w tym metod biologii molekularnej i badania oddziaływań białko-białko. W ogromnej większości opis metod jest precyzyjny i wystarczająco wyczerpujący. Za szczególnie wartościowe uważam szczegółowe opisy procedur oczyszczania białek, które często są wieloetapowe i wymagają zastosowania odpowiednich buforów. Dokumentuje to niewątpliwie ogrom pracy Doktoranta w przygotowaniu materiałów do dalszych badań. Zwłaszcza, że

w wynikach rezultaty tej pracy zostały przedstawione bardzo skrótowo, co może dawać mylne wrażenie o niewielkiej istotności przygotowania białek o odpowiedniej jakości i właściwościach do właściwych badań i eksperymentów. Rzadko spotykany opis metod w pierwszej osobie wzmacnia autorskość opisów. Z drugiej strony, w publikacji z Scientific Reports opis oczyszczania białek ogranicza się do podania odnośników literaturowych, co sugeruje odtwarzanie metodyki oczyszczania raczej niż jej autorskie opracowanie. Poproszę o komentarz w tej sprawie, zaznaczając, że wprowadzanie modyfikacji do istniejących procedur jest bardzo wartościową informacją i powinno być odnotowywane lub przedstawiane w postaci całościowego zmodyfikowanego protokołu oczyszczania.

Rozdział „Wyniki” podzielony jest na osiem części. W pierwszych dwóch podrozdziałach Doktorant przedstawia wyniki oczyszczania komponentów systemu ParDE, gyrazy (GyrAB) oraz proteaz bakteryjnych, jak również potwierdza aktywność i funkcjonalność uzyskanych preparatów białkowych. Jest to bardzo ważny etap badań dających gwarancję, że otrzymywanie później wyniki mogą być uznane za wiarygodne. W następnych częściach przedstawiono oryginalne wyniki oddziaływań proteaz ClpAP z antytoksyną ParD i toksyną ParE, wskazując na zdolność do degradacji antytoksyny przez ClpAP, która wzmacniana jest przez obecność DNA w środowisku reakcji. Natomiast toksyna ParE jest stabilna w komórkach gospodarza (*Escherichia coli*) jak również nie jest degradowana *in vitro* przez szereg proteaz (Lon, ClpAP, ClpXp i ClpYQ). Bardzo istotnym wynikiem, zwłaszcza w kontekście ostatnich doniesień literaturowych, jest wykazanie, że związanie toksyny przez antytoksynę chroni tą ostatnią przed efektywną proteolityczną degradacją. Co ważne protekcyjne działanie toksyny ograniczone jest do jej funkcjonalnego partnera (antytoksyny ParD), gdyż jak pokazano inne substraty proteazy ClpAP są degradowane w obecności ParE. Jednak za najważniejszy wynik, wręcz przełomowy, uważam wykazanie, że proteaza ClpAP jest niezbędna do aktywacji i biologicznej funkcjonalności systemu ParDE plazmidu RK2. Stosując szczepy *E. coli*, *Pseudomonas putida* i *Caulobacter crescentus* typu dzikiego oraz z wyłączonym genem podjednostki ClpA proteazy ClpAP Doktorant udowodnił, że jedynie w szczepach o naturalnej aktywności proteolitycznej plazmid kodujący system *parDE* jest stabilnie utrzymywany. Natomiast w szczepach pozbawionych funkcjonalnej proteazy ClpAP jest eliminowany z populacji na równi z plazmidem kontrolnym. Te bardzo interesujące obserwacje *in vivo* zostały następnie potwierdzone badaniami *in vitro*, gdzie wykazano, że rekombinowane proteazy ClpAP z *E. coli*, *P. putida* i *C. crescentus* wydajnie degradują antytoksynę ParD. Zatem można pokusić się o konkluzję, która jednoznacznie nie wybrzmiała przy omówieniu wyników, że funkcjonalność systemu ParDE nie zależy jedynie od aktywności komponentów systemu, to jest od hamowania gyrazy przez ParE i neutralizacji tego efektu przez antytoksynę ParD, ale również od zdolności komórki gospodarza do aktywacji systemu ParDE

poprzez posiadanie odpowiedniego „proteolitycznego włącznika”. Czy zatem komponent proteazowy nie jest niezbędny do faktycznego działania wszystkich systemów TA typu II? Podczas obrony prosiłbym Doktoranta o ustosunkowanie się do tej konkluzji, próbę jej uogólnienia dla innych systemów TA i zaproponowanie eksperymentów weryfikujących tą hipotezę.

Poza jednym wyjątkiem dotyczącym weryfikacji wiązania ParD do promotora *parDE*, gdzie w mojej ocenie zabrakło kontroli specyficzności wiązania (np. fragmentu DNA o podobnej proporcji zasad ale innej sekwencji), eksperymenty zaprojektowane i przeprowadzone są poprawnie. Zawierają stosowne kontrole, powtórzenia i są opracowane statystycznie. Zaskakujące jest zatem, że „moc” uzyskanych wyników w niektórych przypadkach kontrastuje z bardzo ostrożnym ich komentarzem i interpretacją (np. „wyniki (te) sugerują”, strony 56, 59, 66).

Rozdział „Dyskusja” w sposób dojrzały interpretuje otrzymane wyniki w kontekście dostępnej literatury przedmiotu. Na uwagę zasługuje wniosek, że to oddziaływanie proteazy ClpAP z DNA jest kluczowe dla zwiększenia jej aktywności, natomiast oddziaływanie antytoksyny ParD z DNA jest drugorzędne w procesie jej degradacji. W tym kontekście nasuwają się pytania: czy badania aktywności tej proteazy *in vitro* nie powinny być z założenia prowadzone w obecności DNA? Oraz, czy białka wiążące DNA są lepszymi substratami dla ClpAP i czy są to cele molekularne tej proteazy? Pomimo, że badania przedstawione w pracy odnoszą się do systemu TA kodowanego na plazmidzie Doktorant zwraca uwagę, że homologi/paralogi systemu *parDE* występują również w chromosomie bakteryjnym. Dyskutuje przy tym ewentualne wzajemne oddziaływanie krzyżowe komponentów tych systemów oraz wskazuje „pozytywne” efekty ich aktywacji na fizjologię komórek bakteryjnych. Są to bardzo wartościowe spostrzeżenia, zwłaszcza że funkcje systemów TA są wciąż przedmiotem ożywionej dyskusji w środowisku naukowym. Co warto podkreślić w kilku miejscach wskazuje również kierunki dalszych badań, co świadczy o mocnym zaangażowaniu w tematykę badań, dogłębnym przemyśleniu wyników a w konsekwencji o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Generalnie, pod względem językowym i edytorskim praca jest poprawna. Rysunki i tabele są czytelne i bardzo szczegółowo opisane, mają też swoje odnośniki w tekście. Ponieważ duża część wyników pracy została już opublikowana to niewątpliwym uchybieniem jest brak jasnych odniesień do tego faktu w pracy. Między innymi zauważyłem znaczące podobieństwo streszczenia angielskiego z abstraktem wspomnianej pracy. Ponadto większość rysunków zamieszczonych w wynikach, poza spolszczeniem, jest identyczna jak w pracy z Scientific Reports. Również rycina 2 ze wstępu jest bardzo podobna do ilustracji z pracy Kędzierska i Hayes, 2016 opublikowanej w Molecules. Praca posiada zauważalną ilość tak zwanych literówek. Natomiast co warto podkreślić wolna jest od żargonu laboratoryjnego i skrótów myślowych. Z obowiązku recenzenta zwracam ponadto uwagę na

niepoprawne sformułowanie „(antybiotyko)odporność bakterii”, str. 77 oraz podawanie stężeń w jednostkach masy (ng) w podpisach do rycin 7, 14 i 16.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pana Andrzeja Dubiela jest poprawnym opracowaniem bardzo ciekawego zagadnienia naukowego dotyczącego molekularnych mechanizmów aktywacji systemu toksyna-antytoksyna *parDE*. Podczas badań Doktorant posługiwał się technikami z dziedziny biologii molekularnej oraz biochemii i stworzył znaczącą ilość materiałów które mogą być wykorzystane do dalszych badań. Uzyskane wyniki są oryginalne i wnoszą nowe informacje dotyczące roli proteazy ClpAP w aktywację systemu ParDE oraz konsekwencji tej aktywacji dla utrzymywania się plazmidów w populacji bakterii. Uważam, że praca spełnia wymagania zwyczajowe oraz formalne stawiane w stosownych przepisach prawa (art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami)), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr. inż. Andrzeja Dubiela do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maciej' followed by a stylized flourish.