



dr hab. Urszula Zielenkiewicz

Warszawa, 27.01.2019r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Ropelewskiej

„Znaczenie N-końcowej domeny oraz struktury czwartorzędowej proteazy Lon
Escherichia coli”

dla Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Małgorzaty Ropelewskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Igora Koniecznego w Uniwersytecie Gdańskim. Białka opiekuńcze i proteazy są obecne w obszarze zainteresowań naukowych prof. Igora Koniecznego od wielu lat. Jego osiągnięcia na tym polu, uczyniły go jednym z największych autorytetów w tym temacie.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Ropelewskiej dobrze wpisuje się w nurt badań kierowanego przez prof. Koniecznego zespołu. Przedmiotem rozprawy jest jedna z trzech, N-końcowa domena białka Lon *Escherichia coli*, proteazy która pełni w komórce liczne i bardzo ważne funkcje. Funkcje te zostały w sposób przejrzysty opisane we wstępie dysertacji, w którym zawarto również szerokie tło proteostazy komórkowej w odniesieniu do komórek bakterii ze szczególnym uwzględnieniem *E. coli*.

Proteaza Lon to dosyć niezwykły enzym z rodziny proteaz AAA+ łączący aktywność białka opiekuńczego z aktywnością proteolityczną. Z racji (uniwersalnej w świecie organizmów) istotności dla prawidłowego funkcjonowania komórki, Lon jest jedną z najintensywniej badanych proteaz niezależnie od przynależności organizmu do kategorii taksonomicznej. Na skutek historii ewolucyjnej, w komórkach eukariotycznych białka proteolityczne typu Lon występują w organellach

pochodzenia prokariotycznego gdzie pełnią podobne funkcje kontroli jakości białek oraz regulacji odpowiedzi komórkowej na stres. W świecie bakterii Lon jest jedyną proteazą zdolną do tworzenia kompleksów nukleoproteinowych, który to aspekt wiąże recenzowaną dysertację z wcześniejszymi, niedawno opublikowanymi, badaniami mgr M. Ropelewskiej w grupie prof. Koniecznego. Obecnie badania skupione są na szczegółowej analizie efektów delecji w obrębie domeny N-końcowej, zaprojektowanymi z uwzględnieniem subdomen wyznaczonych na podstawie opracowanego na potrzeby badań modelu pogładowego dodekameru Lon. Pozostała część białka Lon (domeny ATPazowa i peptydazowa) pozostają zachowane.

Celem pracy doktorantki, sformułowanym jasno w wyodrębnionym podrozdziale dysertacji (rozdział 3), było zbadanie znaczenia domeny N-końcowej oraz struktury czwartorzędowej dla funkcjonowania proteazy Lon *E. coli*. Dla realizacji tego celu zastosowane zostały wielostronne podejścia metodologiczne i różnorodne techniki biochemiczne, w tym bardzo nowoczesne.

Realizacja celów pracy odzwierciedla w dużym stopniu kolejne kwestie charakterystyki ogólnej proteazy Lon podnoszone we wstępie, w odniesieniu do domeny N-końca tego białka. Są to zatem doświadczenia analizujące w warunkach stresowych fenotypy komórek transformowanych plazmidami eksprymującymi skrócone białka Lon, analizujące struktury drugo- i czwartorzędowe wszystkich skróconych białek, a także analizujące właściwości biochemiczne poszczególnych wariantów. W wielkim skrócie, dla realizacji tego celu, doktorantka:

- zaprojektowała i skonstruowała szereg przemyślanych mutantów (wariantów) proteazy Lon pozbawionych odpowiednio wybranych subdomen (wszystkie także w wersjach fuzyjnych z cząsteczką stabilizującą SUMO);
- przeprowadziła badania zachowania się komórek będących nosicielami plazmidów z wariantami *lon* w wybranych warunkach stresowych (różne temperatury i naświetlanie UV);
- oczyściła wszystkie wersje badanych białek oraz kilka substratów proteazy Lon, a następnie przy ich użyciu
- przeprowadziła różnorodne badania *in vitro* w odniesieniu do zdolności poszczególnych mutantów do budowania struktur wyższego rzędu, a także

rozpoznawania i wiązaniu substratu oraz wpływu danej delecji na aktywność ATPazową i w konsekwencji proteolityczną białka Lon.

Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie przez doktorantkę modelowania molekularnego *in silico* jako podstawy do racjonalnego zaplanowania części eksperymentalnej pracy badawczej, a także uwzględnienie wniosków z analiz tych modeli w dyskusji uzyskanych wyników.

Układ samej pracy jest standardowy i zawiera klasyczny podział na wstęp, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz bibliografię. O poziomie kompetencji pokazanych we wstępie i szczegółowej analizie uzyskanych wyników może świadczyć około 200 cytowanych pozycji; przywołujących zarówno pierwsze, charakteryzujące mutanty *E. coli* wrażliwe na UV prace z lat 60-tych, jak i najbardziej aktualnej literatury.

Opis użytych metod (rozdział 5) jest rozbudowany i szczegółowy, niekiedy wręcz niepotrzebnie detaliczny, jak np. w opisie zupełnie standardowej transformacji komórek bakterii. Natomiast jest bardzo zdawkowy dla elektroforezy natywnej, która uważana jest za trudną i chimeryczną.

Wyniki przeprowadzonych badań są opisane w sposób klarowny w rozbudowanym rozdziale 6, każdorazowo wraz z przedstawieniem hipotezy będącej podstawą planowania danego eksperymentu, jego szczegółowego opisu i udokumentowania, oraz podsumowania. W tej części pracy znajdują się też często stosowne komentarze w odniesieniu do użytych metod czy zastosowanych parametrów reakcji, a także rozbieżności uzyskanych rezultatów.

W efekcie szeroko zakrojonego planu badawczego i konsekwentnego rozbudowywania części eksperymentalnej wraz z pojawiającymi się w toku pracy pytaniami mgr Ropelewska otrzymała bardzo wiele szczegółowych wyników. Ich omówienie przekracza ramy recenzji. Do najważniejszych uzyskanych przez doktorantkę wyników badań należą te wskazujące na istotność N-domeny proteazy Lon dla przeżywania komórek *E. coli* w warunkach stresu naświetlania UV (ale już nie stresu temperaturowego) oraz w tworzeniu i stabilizacji jej struktury czwartorzędowej.

Otrzymany obraz właściwości białka Lon w różnych wariantach pozbawionych określonej subdomeny oraz mutantu stabilnie tworzącego dodekamery pozwolił

doktorantce na sformułowanie prawidłowości tworzenia struktur czwartorzędowych badanego białka, a tym samym określić znaczenie N-końcowej domeny w funkcjonowaniu proteazy Lon. Mimo braku całkowitej zgodności wyników uzyskanych różnymi metodami dla określenia stanu oligomerycznego poszczególnych mutantów, przedstawione rezultaty eksperymentów (zwłaszcza sieciowania chemicznego) są spójne z analizą informatyczną opracowanego modelu dodekameru. Dodatkowym potwierdzeniem postulowanej roli N-domeny w stabilizacji struktury czwartorzędowej proteazy Lon są wyniki doświadczeń *in vitro* uzyskane dla wariantu Lon Δ 300, który tworzy wyłącznie heksamery i wykazuje znaczne osłabienie oddziaływania z substratem oraz aktywności proteolitycznej.

W kilkunastostronicowej, znakomicie skonstruowanej Dyskusji (rozdział 7), nie są pomijane wyniki niejednoznaczne, a z drugiej strony proponowane są określone podejścia eksperymentalne, które mogłyby przyczynić się do rozstrzygnięcia danej kwestii. Ze względu na wielość zarówno przebadanych wariantów białka proteazy jak i ich zweryfikowanych atrybutów, bardzo dobrym pomysłem było zamieszczenie w dyskusji tabeli (Tabela 2) zestawiającej zaobserwowane fenotypy, cechy struktury i aktywności poszczególnych mutantów białka Lon.

W dyskusji wyników dotyczącej aktywności ATPazowej badanych wariantów proteazy Lon autorka rozważa jej zależność od struktury czwartorzędowej (stabilny ale mniej aktywny dodekamer vs bardziej aktywny heksamer) postulując wykonanie sieciowania Lon *in vivo* w różnych warunkach wzrostu bakterii celem określenia natywnego stanu oligomerycznego proteazy. To bardzo dobra strategia, która powinna być przeprowadzona. Chciałabym jednak zapytać również, czy można zaprojektować takie warunki reakcji proteolizy *in vitro*, w których niezmieniona proteaza Lon tworzyłaby w większości heksamery bądź dodekamery co pozwoliłoby na bezpośredni pomiar jej aktywności w obu stanach oligomeryzacji?

Doktorantka wspomina również o możliwości (i potrzebie) badań z użyciem mutantów chromosomalnych odpowiadających tym już wprowadzonym na plazmidach ekspresyjnych. Wskazuje nawet odpowiednie narzędzia do tych manipulacji genetycznych. Czy takie prace są już prowadzone i stanowią element istotny dla opublikowania już uzyskanych wyników?

Jedynym drobnym niedostatkim pracy jest, w moim odczuciu, brak konsekwencji w użyciu mutantu Lon Δ 300. Oczyszczone białko Lon Δ 300 zostało użyte w prawie wszystkich eksperymentach *in vitro* (ale nie np. w elektroforezie natywnej), natomiast w eksperymentach *in vivo* już nie. Identyczny zestaw białek wariantów Lon użyty w obu typach podejść badawczych zapewniłby większą spójność przeprowadzonym eksperymentom.

Zapewne najtrudniejsze do interpretacji są wyniki dotyczące zdolności do hydrolizy ATP przez kolejne mutanty delecyjne Lon. Jednak, przedstawione przypuszczenie, że do mutantu Lon Δ 176 substrat wiąże się niespecyficznie jest raczej tropem niepewnym skoro w analizach wiązania TrfA pokazano spadek siły wiązania tylko o 30 %. Jakie dalsze analizy, o których wspomina doktorantka można by przeprowadzić żeby wyjaśnić przyczyny obserwowanych zmian?

Na Ryc. 16, w trzech ścieżkach dla skróconych wariantów Lon widoczne są prążki migrujące praktycznie na tej samej wysokości (ok. 80 kDa). Autorka rozprawy pisze, że mogą w przybliżeniu odpowiadać wielkością odpowiednich monomerów. Jednak, wyliczone wielkości mas molekularnych tych wariantów różnią się znacznie między sobą. Chciałabym zapytać, jaki element procedury elektroforezy natywnej mógłby zdaniem doktorantki być odpowiedzialnym za obserwowany efekt?

Na końcu rozprawy doktorantka stwierdza: „Opracowanie metod regulacji aktywności proteazy Lon mogłoby w przyszłości być wykorzystane jako alternatywna metoda kontroli wzrostu drobnoustrojów”. Chciałabym prosić doktorantkę o rozwinięcie tej kwestii; jakiego typu metody wyobraża sobie jako umożliwiające taką kontrolę?

Rozprawa przygotowana jest niezwykle starannie, z dbałością o szatę graficzną i szczegóły edytorskie, co sprawia, że pracę przegląda się z przyjemnością. Nieco w kontraście do tej staranności graficznej, w tekście rozprawy napotykamy stanowczo zbyt dużą ilość drobnych błędów, zwłaszcza typu „literówek”, które niekiedy mogą być znaczące (np.: zamieniające stymulację na *symulację* ATPazy). Ze względu na brak możliwości korekty już wydrukowanej pracy ograniczę się jedynie do zasygnalizowania tej kwestii, bez wymieniaania poszczególnych pozycji (kilka przykładowych niedociągnięć wymieniam na końcu recenzji, poza jej treścią).

Nieliczne pomyłki dotyczą zazwyczaj metodyki, jak np.: odesłanie czytelnika do nieistniejącej Metody 5.11.2 (s.57; powinna to być zapewne 5.18.2), podobnie

odesłanie do Metody 5.9 jako opisującej PCR podczas gdy dotyczy ona fosforylacji (powinna to być zapewne Metoda 5.4), czy zamiana kolejności sonikowania i inkubacji z lizozymem komórek podczas oczyszczania białka SulA. Skądinąd bardzo pożyteczny dla czytelnika system przywoływania miejsca opisu użytej w danym eksperymencie metody, staje się niekiedy nużący gdy odsyła do listy urządzeń, buforów czy plazmidów. Niepotrzebne wydaje się również rozwijanie w tekście skrótów uprzednio opisanych w Indeksie skrótów.

Powyższe uwagi w najmniejszym stopniu nie wpływają na moją bardzo wysoką ogólną ocenę rozprawy doktorskiej mgr M. Ropelewskiej. Używając szerokiego wachlarza metod eksperymentalnych i teoretycznych uzyskała Ona wiele ciekawych wyników dotyczących fizjologicznie bardzo ważnej proteazy, które starannie przeanalizowała, wyciągając umotywowane wnioski, omówione następnie w świetle literatury przedmiotu. Badania te zostały przedstawione we wzorowo napisanej, obszernej rozprawie.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Ropelewskiej stanowi oryginalny wkład do rozwiązania ważnego problemu naukowego, potwierdza jej ogólną wiedzę w dyscyplinie oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. W opinii recenzenta rozprawa doktorska Małgorzaty Ropelewskiej spełnia wszystkie wymagania ustawowo i zwyczajowo stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Małgorzaty Ropelewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Przykładowe literówki i błędy edytorskie

- s.13. akumulacja *włókiem*
 - s.14. *stes* (zamiast stres)
 - s.32. *proteza jest zaangażowany*
 - s.46. dwukrotnie wymieniony system ekspresyjny Champion™
 - s.62. preparat *biała* (zamiast białka)
 - s.64. zmniejszenie *ilość*
 - s.65. (...) na każdy hodowli (zapewne każdy ml), wykorzystano drugą *zasadą*
 - s.66. na szkiełkach *mikroskopowym*
 - s.67. powtórzone słowo: kamery, zastosowano *warunku*
 - s. 68. mechanizmów *regulującuch* aktywność
 - s.83. wyniki uzyskane *metoda*
- etc ...