

wpz. 26.08.2020 lnc



dr hab. Urszula Zielenkiewicz

Warszawa, 18.08.2020.

Zakład Biochemii Drobnoustrojów
e-mail: ulazet@ibb.waw.pl
tel: 48 22 592-13-07

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anrzeja Dubiela

pt.: „Proteaza ClpAP jako czynnik kontrolujący aktywację systemu toksyna-antytoksyna *parDE* plazmidu RK2”

dla Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

Rozprawa mgr inż. Andrzeja Dubiela, wykonana w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem Profesora Igora Koniecznego, została przedstawiona do oceny w języku polskim, jako klasyczna dysertacja zawierająca standardowe elementy prac doktorskich jak wstęp, cele pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję wraz z podsumowaniem, spis przywołanej literatury, a także streszczenie (również w języku angielskim) oraz indeks skrótów. Praca uzupełniona została o dane dotyczące struktur badanych białek w postaci 4 załączników.

Przedmiotem rozprawy jest aktywacja systemu toksyna-antytoksyna (w skrócie TA) typu II *parDE* kodowanego w plazmidzie RK2 o szerokim zakresie gospodarzy wśród bakterii Gram-ujemnych, często o znaczeniu klinicznym. System *parDE* plazmidu RK2/RP4 jest jednym z najwcześniej odkrytych (pierwsze doniesienia pojawiają się jeszcze pod koniec lat 80-tych ubiegłego wieku) i najintensywniej badanych systemów TA. Zainteresowanie tym plazmidem spowodowane było i jest z jednej strony jego zdolnością do łatwego przenoszenia wieloantybiotykooporności (kanamycyna, ampicylina i tetracyklina) pomiędzy szczepami klinicznymi np.: *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella aerogenes*, a z drugiej jego wyjątkową wielowarstwową regulacją funkcjonowania ściśle powiązaną z czynnikami środowiska. Szczegółowe badania plazmidu RK2 wielu grup uczonych, w tym również Profesora Koniecznego, promotora ocenianej dysertacji, doprowadziły do odkrycia wielu procesów biologii plazmidów, mechanizmów ich replikacji i segregacji, transferu pomiędzy komórkami, a także stabilnego utrzymywania w populacjach bakterii. Warsztat badawczy zespołu prof. I. Koniecznego budowany wokół tematyki struktur białek, w szczególności tzw. białek

opiekuńczych oraz oddziaływań białek z DNA stwarza wyjątkowe możliwości dogłębnego analizowania różnych aspektów funkcjonalnych oraz strukturalnych białek i kompleksów białkowych. Warsztat ten został w pełni wykorzystany przez mgr inż. Dubiela w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Główną część ocenianej pracy doktorskiej stanowią wyniki opublikowane w pracy, której mgr inż. A. Dubiel jest pierwszym autorem w wielodyscyplinarnym czasopiśmie "Scientific Reports" w systemie otwartego dostępu i o wysokim współczynniku oddziaływania (IF bliski 4), w 2018 roku. *De facto*, dysertacja jest w dużej mierze wiernym odtworzeniem pracy opublikowanej w SR (nawet główne tytuły podrozdziałów w Wynikach są bezpośrednim tłumaczeniem tychże z angielskiego) z dodatkowym podrozdziałem analizującym konsekwencje utworzenia kompleksu ParD₂ParE₂ dla struktury i działania obu białek. Materiały dokumentujące wyniki eksperymentów zostały w rozprawie jednak nieco inaczej rozlokowane a ich omówienie jest niewątpliwie bardziej dokładne i szczegółowo udokumentowane. Na przykład, na początku rozdziału Wyniki autor zamieścił rycinę zbiorczą (Ryc.1) obrazującą jakość wszystkich oczyszczonych preparatów białkowych użytych w opisanych w pracy eksperymentach.

We wstępie, ze względu na tematykę rozprawy, w naturalny sposób zadedykownemu bakteryjnym systemom toksyna-antytoksyna, mgr inż. Dubiel krótko scharakteryzował ich występowanie oraz klasyfikację, poświęcając nieco więcej miejsca funkcjom biologicznym tych systemów oraz celom komórkowym samych toksyn. W centrum uwagi doktoranta pozostaje aktywacja systemów TA. W tym najobszerniejszym podrozdziale wstępu, doktorant zwięźle przedstawia, nie unikając aspektów nie do końca jeszcze poznanych, różne mechanizmy aktywowania działania wielu systemów TA wykorzystując bogatą i aktualną literaturę. Temat ten powraca w ambitnej Dyskusji w odniesieniu do obserwacji poczynionych w różnych gatunkach bakterii Gram-ujemnych. W zgodzie z tytułem rozprawy, osobny podrozdział dotyczy badanego system TA *parDE* plazmidu RK2.

W celu zrealizowania założeń pracy doktorskiej doktorant przeprowadził cykl eksperymentów zaplanowanych według uznanego wśród badaczy systemów toksyna-antytoksyna schematu, w którym systematycznie pokazywane są poszczególne cechy danego systemu. Jakkolwiek te początkowe etapy pracy doktoranta są w dużej mierze wtórne, gdyż stanowią potwierdzenie wcześniej już zbadanych cech białek ParD i ParE analizowanego systemu, niemniej w sposób kompleksowy charakteryzują system *parDE* plazmidu RK2, jak również jednoznacznie pokazują, że oba białkowe komponenty użyte w dalszych eksperymentach zostały prawidłowo wyprodukowane, oczyszczone i zachowały swoją aktywność. Należy zaznaczyć, iż w żadnym etapie przedstawiania własnych wyników i analiz doktorant nie pomija danych opisanych przez innych autorów.

Prawie wszystkie badania mgr inż. Dubiela zostały przeprowadzone zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Znalazło to swoje odzwierciedlenie w sposobie przedstawienia wyników w ocenianej dysertacji; w kolejnych podrozdziałach Wyników obserwacjom działania analizowanego systemu *parDE* w komórkach bakterii towarzyszą dane uzyskane w testach *in vitro*.

Z uwagi na to, że większość zawartych w dysertacji wyników jest przejrzyście przedstawiona w opublikowanej (a więc również zrecenowanej merytorycznie i zaakceptowanej przez uznanych ekspertów) pracy - nie będę ich szczegółowo omawiać, a moje uwagi ograniczę do ogólnych i nielicznych krytycznych.

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych w komórkach *Escherichia coli* Doktorant pokazał istotną różnicę w stabilności białek toksyny ParE i antytoksyny ParD, a jednocześnie wykazał znacząco zwiększoną stabilność antytoksyny ParD w mutancie pozbawionym proteazy ClpA jak również w komórkach ze zwiększoną produkcją białka toksyny ParE. Jest to niezwykle istotny wynik uważany powszechnie (i często wykorzystywany w tego typu badaniach) za rozstrzygający kwestię, która proteaza degraduje antytoksynę danego systemu TA w komórkach gospodarza. Zaobserwował również, że system TA *parDE* przeniesiony do niespokrewnionego plazmidu nie posiadającego żadnego systemu wspomagającego dziedziczenie zapewnia jego stabilne utrzymywanie w kolejnych generacjach dzielących się komórek.

Z kolei w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem oczyszczonych przez Doktoranta licznych białek i szeregu uznanych technik, kolejno pokazane zostały: proteoliza białka antytoksyny ParD przez oczyszczoną proteazę ClpAP, wiązanie białka ParD do dwuniciowego DNA zawierającego sekwencję promotorową operonu *parDE*, zwiększenie stabilności antytoksyny ParD przez obecność białka toksyny ParE oraz bezpośrednie hamowanie aktywności gyrazy GyrAB przez toksynę ParE. Potwierdzone również zostało, że obecność antytoksyny ParD niweluje działanie toksyny na gyrazę. W serii testów immunoenzymatycznych i powierzchniowego rezonansu plazmonowego wykazano oddziaływanie pomiędzy białkiem ParD i ParE, a także ATPazy ClpA z antytoksyną ParD (choć już nie z białkiem ParE).

Zasadniczym osiągnięciem doktoranta jest wykazanie za pomocą obu rodzajów badań (to znaczy zarówno w komórkach bakterii jak i w testach fizyko-chemicznych), że to proteaza ClpAP degraduje antytoksynę ParD i jest czynnikiem aktywującym system TA *parDE* w komórkach różnych gatunków bakterii utrzymujących plazmid RK2. Ten właśnie wątek badań mgr inż. Dubiela zaowocował publikacją, której motywem przewodnim jest pokazanie ClpAP jako uniwersalnego czynnika aktywacji systemu *parDE* plazmidu RK2 (cyt. tytuł: "*ClpAP protease is a universal factor that activates the parDE toxin-antitoxin system from a broad host range RK2 plasmid*"). Szkoda, że rozważany temat ewolucji białka ParD jako uniwersalnego substratu dla proteaz ClpAP ani uniwersalność wskazanych w sekwencji ParD motywów dla rozpoznawania przez homologi ClpA nie zostały rozwinięte do czasu napisania dysertacji.

Całkowicie nowe, odrębne w stosunku do publikacji są rozważania oparte o struktury dimerów białek ParD, ParE i tetrameru ParD₂E₂ uzyskane w wyniku modelowania homologicznego (względem ParD z RK2 oraz heterotetrameru homologicznych białek ParDE z *Caulobacter crescentus*) oraz superpozycjonowanie kompleksu ParD₂ z DNA oraz ParD₂ w kompleksie z ParE₂ z DNA. Do tej części pracy, niewątpliwie interesującej, mam następujące pytanie:

W przywołanej pracy (Dalton i Crosson, 2010), jej autorzy, na podstawie uzyskanych struktur kompleksu heterotetrameru ParD-ParE oraz wolnej antytoksyny ParD, jednoznacznie stwierdzają, że wolne białko ParD z *C. crescentus* przyjmuje konformację ustrukturyzowaną – helikalną i raczej nie podlega znaczącej przemianie ze stanu nieuporządkowanego do uporządkowanego po związaniu z toksyną ParE (cyt.: „*Finally, we provide evidence that the unbound ParD antitoxin is not natively unstructured like the ParD protein from plasmid RK2. Rather, ParD adopts a structured, helical conformation and thus does not likely undergo a significant disorder-to-order transition upon binding its cognate ParE toxin*”). Skąd więc w dyskusji doktoranta znalazło się twierdzenie, że cyt.: „Potencjalną stabilizację struktury nieuporządkowanego C-końca ParD w kompleksie z ParE pokazano w przypadku systemu z *C. vibrioides* (szczep ATCC 19089 / CB15) (Dalton i Crosson, 2010)”? Nie jest wykluczone, że badane w pracy doktorskiej białko ParD rzeczywiście podlega zmianom konformacyjnym po związaniu w kompleksie z ParE, gdyż jak pokazano dla dimeru ParD z RK2 (Oberer et al. 2007) C-końcowy fragment tego białka jest nieustrukturyzowany w nieobecności toksyny, jednak wobec powyższego wywód Doktoranta nie jest klarowny. W tej samej pracy zademonstrowana jest możliwość wiązania dwóch-trzech dimerów ParD w sekwencji promotorowej operonu *parDE*. Doktorant pokazuje model, w którym oba potencjalne miejsca wiązania okupowane są przez tetramer ParD₄. Czy mogę prosić o komentarz do tych wyników? Czy przedstawione dane *in vitro* i model wykluczają możliwość wiązania odrębnych dimerów (dwóch lub trzech) ParD?

Wiadomo, że proteaza ClpAP może oddziaływać z białkiem adaptorowym żeby zwi ązać się z białkiem degradowanym. Czy w świetle własnych wyników (*in vitro* degradacja ParD przez ClpAP z różnych gatunków bakterii), wspomnianych własności białka ClpA i postulowanej uniwersalności tej proteazy dla aktywacji sysemu *parDE*, doktorant uważa, że można wykluczyć istnienie białka adaptorowego w tym systemie?

W rozprawie na uwagę zasługują staranność wykonania testów *in vitro* (bardzo dobrze świadcząca o znakomitym opanowaniu przez doktoranta różnorodnych technik labolatoryjnych), dobrej jakości dokumentacja, ale również fakt zastosowania każdorazowo wzajemnych kontroli, dzięki którym wyniki eksperymentów są jednoznaczne. Pewnym utrudnieniem w śledzeniu omawianych wyników jest niekiedy niestandardowe umiejscowienie odpowiadających rozważaniom rycin, obrazujących wyniki przeprowadzonych eksperymentów (np.: Ryc. 7 i 8 zamieszczone na stronach 54 i 55 omawiane są odpowiednio na stronach 55 i 56).

Doktorant nie uniknął też niestety licznych niedociągnięć edytorskich; w dysertacji sporo jest błędów literowych, a także nieprawidłowych końcówek zmieniających gramatykę zdań i utrudniających śledzenie tekstu. Wskazanie poszczególnych niedociągnięć na obecnym etapie uważam za bezcelowe. Opisy procedur oczyszczania białek ClpA dla *E. coli* i dla *C. crescentus* oraz *P. putida* są praktycznie identyczne – rozdział 5.13.5 mógłby być zatem ograniczony do podania stosownej informacji o użytych szczepach i stężeniu induktora. Niepotrzebnie też używa doktorant zamiennie nazw *C. crescentus* vs *C. vibrioides*.

Zabrakło mi również informacji o sekwencjach genów *parD* i *parE* oraz porównaniach analizowanych sekwencji zarówno w odniesieniu do homologicznych elementów systemu *parDE* jak i proteazy ClpAP.

Pomimo powyższych uwag, w mojej opinii, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszelkie ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim z dziedzin obejmujących nauki przyrodnicze. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Anrdzeja Dubiela do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



