



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ KOMÓRKI
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 62 49 | +48 71 375 62 73
fax +48 71 375 62 34

mitplant@ibmb.uni.wroc.pl | www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. dr. hab. Hanna Janska

Wrocław, 2024-05-10

hanna.janska@uwr.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Lorencik zatytułowanej „Identyfikacja ścieżek transportu elektronów w oddechowym kompleksie III na podstawie mutagenyzy i badań biochemicznych”

Ponad 20 lat temu odkryto w błonach niektórych bakterii enzym nazwany alternatywnym kompleksem III (ACIII), pełniącym funkcję podobną do kompleksu III łańcucha oddechowego zlokalizowanego w błonie mitochondrialnej eukariota. Mimo tej samej funkcji, ACIII posiada znacznie różniącą się strukturę potwierdzoną ostatnio metodą cryo-EM. Na podstawie dostępnych danych strukturalnych i biochemicznych zaproponowano kilku mechanizmów działania ACIII w bakteriach. Głównym celem ocenianej rozprawy było skonstruowanie systemu do manipulacji genetycznych w obrębie genów kodujących polipeptydy kompleksu ACIII bakterii *Flavobacterium johnsoniae* i jego wykorzystanie do weryfikacji doświadczalnej proponowanych molekularnych mechanizmów działania tego enzymu.

Praca ma formę tradycyjnej rozprawy i przedstawia zarówno opublikowane jak i nie opublikowane wyniki. Powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Osyczki oraz dr Roberta Ekierta w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Rozprawa liczy łącznie 157 stron i zawiera wszystkie elementy wymagane od tego typu tekstów naukowych. Choć praca napisana jest poprawnym językiem, opatrzona staranną szatą graficzną, nie udało się Doktorantce uniknąć licznych błędów edytorskich.

Wstęp napisany jest świetnie: jasno, ciekawie, bez zbędnych szczegółów. Czytałam go z zainteresowaniem i przyjemnością. Zanim autorka skupi się na budowie i proponowanych modelach mechanizmu działań alternatywnego kompleksu III u bakterii przedstawia informacje o kofaktorach enzymów transferu elektronów jak i samych kompleksach transferu elektronów. Wstęp kończy rozdział na temat bakterii *Flavobacterium johnsoniae* z uzasadnieniem dlaczego wybrano tę bakterię jako model badawczy. Rozdziały „Metody” i „Materiały” to łącznie około



30 stron. Należy podkreślić, że stosowana przez doktorantkę metodologia jest bardzo różnorodna i obejmuje obok technik biologii molekularnej także metody biochemiczne i biofizyczne. Ogólnie, dostarczane informacje są wystarczające do oceny poprawności stosowanych metod eksperymentalnych, choć były wyjątki. Na przykład, brakowało mi w czasie czytania wyników informacji o lokalizacji starterów używanych w różnych reakcjach PCR czy sekwencjonowaniu. Tylko dla kilku zaznaczono lokalizację (rys. 5.1). Co prawda, sekwencje wszystkich starterów zawarte są w tabelce znajdującej się w rozdziale „Materiały” i można na ich podstawie znaleźć lokalizację, ale wymaga to czasu i utrudnia analizę.

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna opis doświadczeń jakie wykonano w celu otrzymania szczepów *F.johnsoniae* z delecją sekwencji kodujących podjednostki hemowe, *ActA* i *ActE*, operonu ACIII. Informacje potrzebne do zrozumienia systemu genetycznego umożliwiającego te manipulacje zawarte są nie tylko w wynikach, ale również w metodach i załącznikach. Trochę utrudniało mi to czytanie, ale rozumiem w pełni zamysł takiej organizacji. System wykorzystuje technikę wymiany alleli opracowaną wcześniej przez innych naukowców i umożliwia selektywne usunięcie interesującej sekwencji z genomu bakteryjnego. Weryfikacja delecji obejmowała odpowiednie reakcje PCR, sekwencjonowanie oraz obserwacje fenotypowe mutantów po komplementacji plazmidem umożliwiającym ekspresję usuniętej sekwencji kodującej. Skuteczna komplementacja, która miała potwierdzać, że usunięto tylko interesującą nas sekwencję okazała się nie łatwym zadaniem, ale po zastosowaniu różnych strategii doktorantka znalazła odpowiedni system i zakończyła badania sukcesem. Okazało się bowiem, że nadekspresja podjednostek hemowych *ActA* i *ActE* jest letalna. Ominięcie tego problemu wymagało manipulacji siły promotora za pomocą mutagenyzy. Szczepy delecyjne po komplementacji plazmidami z limitowaną siłą promotora odzyskiwały porównywalne tempo wzrostu do typu dzikiego. Do tej metodologicznie interesującej części mam kilka pytań. Dlaczego przeprowadzono badania na poziomie DNA, białek, zmian szybkości wzrostu, a nie sprawdzano poziomu transkryptu? Pytanie o poziom transkryptu zadawałam sobie kilka razy w czasie czytania rozprawy w jej różnych miejscach. Jak wyznaczono długość promotora natywnego *ActA* czyli 219bp ? Dlaczego wybrano wektory o aktywności pOmpA na poziomie 75%, 60%, 42% ? Czy mierzono eksperymentalnie siłę promotora po mutagenyzy czy oparto się jedynie na danych literaturowych? Na rys. 5.1.A brak jest wytłumaczenia znaczenia liczb w prostokątach otaczających operon, a opis diagnostycznego PCR na rys. 5.1.B jest zaskakujący. Nie jest możliwe za pomocą PCR ocenić długość pasma z dokładnością do nukleotydy, a takie liczby są na rysunku. Uwaga ta odnosi się do obrazów elektroforetycznych wszystkich diagnostycznych reakcji PCR prezentowanych w rozprawie.

Następnie doktorantka podjęła się scharakteryzowania biochemicznie i biofizycznie otrzymanych mutantów delecyjnych. W pierwszej kolejności przeprowadza barwienie hemów *c* w preparatach białek błonowych po elektroforezie i potwierdza brak białek hemowych ActA i ActE w otrzymanych mutantach nazwanych odpowiednio ΔA i ΔE . Drobną uwagę: nie mogłam znaleźć informacji jaką ilość białka nanoszono na ścieżkę żelu w przypadku tych elektroforez, a informacja ta jest przydatna gdyby powtarzano procedurę. Rezultaty powyższych doświadczeń pozwoliły zaobserwować bardzo ciekawą zależność w przypadku mutantu ΔA , a mianowicie mutant ten dodatkowo nie posiadał białka ActE. Czy wynik ten był zaskoczeniem, czy można było go przewidzieć na podstawie dostępnych danych literaturowych? Czy podjęto badania na poziomie transkryptu? Charakterystyka mutantów delecyjnych i ich rewertantów uzyskanych w wyniku komplementacji obejmowała pomiary aktywności ACIII z wykorzystaniem tlenometrii EPR. Uzyskane wyniki wskazują, że transfer elektronów pomiędzy ACIII a oksydazą *aa3* zachodzi przy udziale podjednostki ActA. Podjednostka ActE nie jest wymagana do przeniesienia elektronów, mimo to jej brak negatywnie wpływa na tempo wzrostu komórek, wskazując na inną, jeszcze niezidentyfikowaną funkcję tej podjednostki.

Wszystkie powyżej wspomniane wyniki zostały opublikowane w roku 2021 w *Microbiology Spectrum*, czasopiśmie o współczynniku oddziaływania około 4.0. Publikacja ma siedmiu autorów, a pierwszym autorem jest Pani Katarzyna Lorencik. Czy doktorantka była jedynym wykonawcą wszystkich doświadczeń? Brak jest tego typu informacji w rozprawie doktorskiej. Nieopublikowane wyniki opisane w rozprawie doktorskiej można podzielić na dwie części. Celem pierwszej części badań było zweryfikowanie postulowanych ról 5 i 6 hemu *c* podjednostki ActA i roli hemu *c* podjednostki ActE w transferze elektronów poprzez wprowadzenie mutacji punktowych do sekwencji wiążących hem. Okazało się, że mutacje motywów wiążących hem skutkują brakiem ekspresji białek. Doktorantka postuluje, że najprawdopodobniej ekspresjonowane białka w wyniku braku hemu zwijają się nieprawidłowo i w konsekwencji są degradowane. W tym miejscu ponownie zabrakło mi doświadczenia potwierdzającego obecność odpowiedniego transkryptu np. za pomocą Northern hybrydyzacji, co uwiarygadniałoby hipotezę o zmianach na poziomie post-transkrypcyjnym. Ponieważ selektywne usunięcie hemów nie było możliwe, postanowiono usunąć całą domenę mdA z podjednostki ActA pozostawiając krótki fragment N-końcowy oraz fragment kodujący C-końcową pentahemową domenę stosując technikę wymiany alleli. Eksperymentalnie potwierdzono skuteczność usunięcia zaplanowanego fragmentu DNA z operonu (PCR diagnostyczny) jak i ekspresję białka kodowanego przez nią (wizualizacja białek hemowych po

elektroforezie) . Tak zmodyfikowany szczep nie przenosi elektronów z ACIII na cytochrome *aa3* co wykazano wykorzystując tlenometrię EPR, potwierdzając tym wynikiem przypuszczenie, że hem domeny mdA jest bezpośrednim donorem elektronów dla terminalnej oksydazy. Komplementacja usuniętej domeny mdA zakończyła się niepowodzeniem tzn. nie uzyskano polepszenia szybkości wzrostu mutanta po ekspresji tego białka. Z opisu doświadczenia nie jest dla mnie jasne czy brak komplementacji wynikał z braku ekspresji czy białko było ekspresjonowane, ale nie w ilości czy formie wymaganej w teście komplementacji. Innymi słowy, czy lub jak białko mdA było identyfikowane po ekspresji.

Druga część nieopublikowanych wyników Pani Katarzyny Lorencik pochodzi z badań *in vitro*. Doktorantka podjęła się izolacji kompleksu ACIII typu dzikiego, kompleksu ACIII pozbawionego domeny mdA, jak i samej domeny mdA oraz białka ActE. Po mało skutecznych próbach oczyszczenia kompleksu III przy użyciu złoża niklowego skupiono się na dopracowaniu izolacji z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. W tym ostatnim przypadku oczyszczanie wymagało utworzenia mutanta z metką Strep dołączoną do podjednostki ActE. Największym problemem nie była niska czystość otrzymywanych preparatów, ale ich słaba wydajność. Czy w czasie dopracowywania metody izolacji testowano różne stężenia jednego detergentu ? Jak wybrano stosowane stężenie DDM ? W opisach do rysunków nie podano stężenia DDM, a według recenzenta taka informacja powinna być podana, choć z drugiej strony tego typu informacja zawarta jest w metodach. Najbardziej wydajnym systemem do izolacji kompleksu ACIII typu dzikiego jak i kompleksu ACIII pozbawionego domeny mdA okazało się oczyszczanie ich z odpowiednich szczepów przy użyciu chromatografii powinowactwa w obecności DDM, gdy metka Strep była rozdzielona sekwencją łącznika od sekwencji kodującej podjednostkę ActE. Natomiast samodzielna domena mdA i podjednostka ActE były oczyszczane po ich heterologicznej ekspresji w *E.coli*. Teoretycznie przewidziane sekwencje sygnałowe tych białek zostały zastąpione sekwencją kierującą do periplasmy *E.coli*, co skutkuje tym, że oba białka izolowane są jako rozpuszczalne. Czy nie obawiano się możliwości, że usunięcie kotwic lipidowych z N-końca białka ActE zmieni jego właściwości? Wyizolowane kompleksy i białka poddano miareczkowaniu potencjometrycznemu z wykorzystaniem spektroskopii optycznej, która pozwala określić wartości potencjałów należących do hemów. Na podstawie otrzymanych wyników doktorantka uważa, że hemy podjednostki ActE oraz domeny mdA charakteryzują się najwyższymi potencjałami. Wyniki kończą próby bezpośredniego pomiaru aktywności ACIII z mutanta *F. johnsoniae* pozbawionego domeny mdA jak również oksydazy *aa3* na wyizolowanych białkach. Nie mogłam jednak znaleźć informacji jak oczyszczono oksydazę

aa3. Jak pisze doktorantka bezpośrednie pomiary aktywności nie są zadaniem trywialnym i na postawie zdobytego doświadczenia uważa, że wymagają warunków restrykcyjnie beztlenowych.

Dyskusja jest napisana w usystematyzowany, choć specyficzny sposób. Większość rezultatów jest dyskutowana w kolejności identycznej jak są opisywane w rozdziale Wyniki. W niektórych przypadkach preferowałabym połączenie rozważań jak na przykład część dyskusji dotyczącej braku ActE w mutantach pozbawionych ActA (str.103) połączyłabym z częścią dyskusji omawiającą wpływ braku domeny mdA białka ActA na ekspresję ActE (str.105). Do tych ważnych i intrygujących obserwacji mam kilka pytań. Czy postulując, że ekspresja pentahemowej domeny białka ActA a nie całego białka ActA jest konieczna do ekspresji podjednostki ActE (str.105) doktorantka sugeruje zależność na poziomie transkrypty czy białka? W dyskusji jest sugestia, że brak ekspresji *ActA*, pierwszej podjednostki operonu kodującego ACIII (str.103), oznacza brak ekspresji całego operonu (str.103).

Oceniając całość dyskusji uważam ją za wnikliwą i na wysokim poziomie naukowym. Doktorantka potrafi krytycznie analizować swoje wyniki i stara się znaleźć logiczne wytłumaczenie dla nich. Wyniki są konfrontowane z dostępnymi danymi literaturowymi, co bezsprzecznie potwierdza dużą wiedzę Doktorantki w zakresie przeprowadzonych badań. Uzyskane przez Kandydatkę wyniki badań, a w szczególności utworzenie sprawnego systemu umożliwiającego genetyczne modyfikacje operonu kodującego ACIII stanowi bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych, szczegółowych badań mechanizmu działania alternatywnego kompleksu ACIII. Zarys takich badań autorka prezentuje jako ostatni podrozdział dyskusji.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Katarzyny Lorencik pt. „Identyfikacja ścieżek transportu elektronów w oddechowym kompleksie III na podstawie mutagenyzy i badań biochemicznych” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Lorencik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Prof. dr hab. Hanna Jańska