



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

5 listopada 2022, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Konrada Pakuły zatytułowanej
„Molekularne podstawy selektywnego transportu fenylopropanoidów
przez białko ABCG46 z *Medicago truncatula*”

Praca doktorska Pana mgr inż. Konrada Pakuły została wykonana pod opieką promotora Pana prof. dr hab. Michała Jasińskiego, oraz promotora pomocniczego Pana dr Jacka Kolanowskiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Temat rozprawy doktorskiej jest związany z głównym nurtem badań laboratorium Pana prof. dr hab. Michała Jasińskiego, jakim są zależności pomiędzy strukturą a funkcją biologiczną transporterów ABC u roślin.

Głównym celem pracy jest wyjaśnienie w jaki sposób struktura białka ABCG46 z lucerny *Medicago truncatula* zapewnia selektywność transportu dwóch metabolitów: likwiritigeniny i kwasu *para*-kumarowego. Ponadto Doktorant podjął się wyjaśnienia, czy aktywność ATPazowa domen wiążących nukleotydy w białkach ABCG46 i ABCG36 jest aktywowana specyficznym przez substraty transportowane przez dane białko. Wyjaśnienie zagadnień podjętych jako temat badań w pracy doktorskiej jest ważne dla wyjaśnienia ogólnych zasad działania transporterów błonowych ABC, które szczególnie licznie funkcjonują w organizmach roślinnych.

Wyniki rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie *Journal of Biological Chemistry*, w której to publikacji Doktorant jest środkowym współautorem, oraz w dwóch pracach dostępnych na serwerze *BioRxiv*, z których w jednej Doktorant jest pierwszym autorem.

Wstęp literaturowy stanowi przejrzyste kompendium wiedzy o rodzinie białek transportujących ABC, ze szczególnym uwzględnieniem białek roślinnych. Doktorant przedstawił klasyfikację strukturalną tej ogromnie licznej grupy białek i omówił najważniejsze różnice pomiędzy białkami występującymi u organizmów eukariotycznych z różnych grup systematycznych. Wyjaśnił także najważniejsze cechy struktur domen



transbłonowych i wiążących nukleotydy budujących białka ABC. Szczególnie dużo uwagi poświęcił budowie i funkcjom białek z podrodziny ABCG, do których należą białka badane w pracy doktorskiej. Przedstawił także szczegółowo stan wiedzy na temat białka ABCG46 z lucerny wraz z wyjaśnieniem miejsca transportowanych przez nie metabolitów w szlaku fenylopropanoidowym. Ogólnie wstęp literaturowy jest napisany bardzo przejrzysto, co wymaga szczególnego docenienia w sytuacji gdy jego tematem są przedstawiciele bardzo licznej i zróżnicowanej strukturalnie oraz funkcjonalnie grupy białek, którym poświęcono już wiele prac badawczych. Poprosiłbym jednak Doktoranta w czasie obrony pracy doktorskiej o wyjaśnienie aspektu, który pozostał dla mnie niejasny. Mianowicie jakie są przyczyny przestrzennego rozdzielania poszczególnych etapów biosyntezy fenylopropanoidów? Tematem pracy jest białko błony komórkowej, które eksportuje z komórki dwa z intermedatów tego szlaku. Czy to znaczy, że poszczególne intermedaty są produkowane w różnych komórkach, lub różnych częściach rośliny, a nie w różnych kompartmentach jednej komórki? Jeśli tak to jaka jest przyczyna specjalizacji różnych komórek w syntezie poszczególnych intermedatów szlaku?

Najważniejszymi osiągnięciami pracy są w mojej ocenie: i) wskazanie, w oparciu o przygotowany przez siebie model struktury białka ABCG46, reszt aminokwasowych znajdujących się w kanale utworzonym przez domeny transbłonowe, które mogą odpowiadać za selektywność tego białka względem transportowanych substratów; ii) eksperymentalne udowodnienie znaczenia reszt aminokwasowych w homologicznych pozycjach 562 i 1213 obu domen transbłonowych ABCG46 dla selektywności substratowej; iii) wyjaśnienie za pomocą symulacji dynamiki molekularnej przyczyn strukturalnych, dla których substytucje w tych pozycjach powodują zmiany selektywności, oraz iv) wykazanie zależności pomiędzy selektywnością transportowanego substratu a zdolnością tego substratu do specyficznej indukcji aktywności ATPazowej domeny wiążącej nukleotydy białek ABCG46 i ABCG36.

W odniesieniu do pierwszego osiągnięcia Doktorant wykonał przewidywanie struktury ABCG46 za pomocą oprogramowania I-Tasser z uwzględnieniem danych dotyczących kowariancji zmienności aminokwasów w homologicznych sekwencjach. W modelu tym stwierdził istnienie kieszeni centralnej w obrębie domen transbłonowych, której położenie było spójne z udziałem w transporcie substratów przez białko ABCG. W oparciu o tę strukturę Doktorant zdefiniował powierzchnię wewnętrzną kieszeni środkowej dostępną dla rozpuszczalnika. Pozwoliło mu to na wskazanie reszt



aminokwasowych budujących tę powierzchnię, a następnie na wykonanie analizy filogenetycznej zmienności tych reszt w prawie 2 tys. sekwencji roślinnych białek ABC. W efekcie tych badań wskazał resztę F562 oraz odpowiadającą jej resztę Y1213 w drugiej domenie transbłonowej jako występujące w pozycjach zmiennych filogenetycznie, co świadczy o ich potencjale do udziału w nadaniu temu regionowi specyficzności substratowej. Interesuje mnie fakt, że wśród pozycji wskazanych przez Doktoranta w tabeli 4.1 podsumowującej te badania są też inne reszty, m.in. fenyloalaniny w helisie 5, które wchodzi w skład powierzchni kieszeni centralnej oraz także nie są silnie zachowawcze. W trakcie obrony poprosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie czy planowano też zbadanie roli tych pozostałych reszt aminokwasowych? Wydaje się, że możliwe byłoby wtedy uzyskanie pełniejszego obrazu elementów strukturalnych uczestniczących w nadaniu selektywności substratowej temu transporterowi.

Analizy biochemiczne mające na celu sprawdzenie roli wskazanych reszt aminokwasowych w selektywności transportu zostały wykonane przy pomocy pomysłowego systemu eksperymentalnego opartego o pęcherzyki błonowe, do wnętrza których badany transporter lub jego mutanty przenosił analizowane substancje. Co ciekawe podczas gdy substytucja fenyloalaniny 562 na resztę tyrozyny, alaniny lub izoleucyny hamowała transport obu substratów, to substytucja F526L hamowała tylko transport kwasu p-kumarowego, a nie likwiritigeniny. Wynik ten wskazuje na rolę reszty aminokwasowej w pozycji 562 w modulowaniu selektywności transportu, a nie tylko na uszkodzenie ważnego strukturalnie elementu, co byłoby alternatywnym wytłumaczeniem gdyby wszystkie substytucje były tak samo szkodliwe dla transportu obu naturalnych substratów. Podczas obrony poprosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie czy jego zdaniem reszta aminokwasowa w pozycji 1213 drugiej domeny transbłonowej ma podobną rolę w zapewnianiu selektywności jak reszta w pozycji 562, czy też odmienną?

Aby wyjaśnić przyczynę dla której mutacje pozycji 562 wpływają na selektywność transportu przez białko ABCG46 Doktorant we współpracy z laboratorium dr Jana Brezovskiego, przeprowadził analizę migracji cząsteczek w drodze do kieszeni centralnej za pomocą metod symulacji molekularnej. Analiza ta pozwoliła na identyfikację wielu dynamicznych tuneli tworzących się w strukturze białka, które mogą pozwalać na migrację cząsteczek do kieszeni centralnej, a następnie na porównanie efektu substytucji reszty aminokwasowej w pozycji 562 na szerokość tych tuneli i



dynamikę ich powstawania. Porównanie barier energetycznych w drodze do kieszeni centralnej białka o sekwencji naturalnej dla dwóch substratów naturalnych i dwóch kontrolnych było zgodne z selektywnością ABCG46 wobec naturalnych substratów. Ponadto porównanie barier energetycznych dla białka o sekwencji naturalnej i mutantów z substytucjami F562L, F562Y i F562A było spójne z obserwowanym eksperymentalnie negatywnym wpływem mutacji F562Y i F562A na transport obu substratów naturalnych. Jednakże wyniki te nie wykazały dużych różnic pomiędzy białkiem o sekwencji naturalnej a mutantem F562L wobec obu substratów naturalnych. Sugeruje to, że przyczyna różnicowego efektu F562L na transport likwiritigeniny i kwasu p-kumarowego wynika z innych właściwości niż dynamika tworzenia tuneli prowadzących do kieszeni centralnej. Czy mógłbym poprosić Doktoranta podczas obrony pracy doktorskiej o przedyskutowanie tego zagadnienia?

Kolejnym osiągnięciem Doktoranta było stwierdzenie, że substraty naturalnie transportowane przez białka ABCG46 z lucerny oraz ABCG36 z rzodkiewnika stymulują kinetykę hydrolizy ATP przez domeny wiążące nukleotydy w tych białkach. Co ciekawe jednak, o ile likwiritigenina wywierała ten efekt na ABCG46, kwas p-kumarowy był pod tym względem neutralny. Czym można tłumaczyć tę różnicę? Czy odpowiadające za nią właściwości kwasu p-kumarowego mogą być powiązane z różnicowym efektem substytucji F562L na transport obu związków?

Podsumowując, praca doktorska Pana mgr inż. Konrada Pakuły przedstawia wyniki bardzo ciekawego, całościowego projektu badawczego prowadzonego od postawienia interesującej hipotezy w oparciu o badania strukturalne i filogenetyczne, poprzez sprawdzenie eksperymentalne tej hipotezy za pomocą metod monitorowania transportu przez badane białko, aż do analizy możliwych mechanizmów prowadzących do obserwowanych efektów za pomocą metod dynamiki molekularnej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr



99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.), w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. inż. Konrada Pakuły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Mikołaj Olejniczak