Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD GENETYKI I FIZJOLOGII KOMÓRKI
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 41 26 | +48 71 375 41 28
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Wrocław, 13 listopada 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Konrada Pakuły pt. "Molekularne podstawy selektywnego transportu fenylopropanoidów przez białko ABCG46 z *Medicago truncatula*" wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Michała Jasińskiego oraz dr. Jacka Kolanowskiego w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Transportery ABC tworzą jedną z najliczniejszych rodzin białkowych i występują we wszystkich domenach życia. Charakteryzują się podobnym planem budowy oraz mechanizmem transportu substancji sprzężonym z hydrolizą ATP. Ze względu na różnorodne funkcje fizjologiczne, znaczenie dla zjawiska oporności wielolekowej oraz oporności roślin uprawnych na patogeny grzybowe, a także powiązanie z chorobami człowieka, transportery ABC są obiektem intensywnych badań od wielu lat. Mimo tego wiedza na temat molekularnych mechanizmów działania tych białek, a w szczególności podstaw selektywności transportu, wciąż jest niewielka. Interesującą grupą transporterów ABC są roślinne białka ABC, które występują szczególnie licznie u roślin lądowych, pełniąc wyspecjalizowane funkcje fizjologiczne, czego wyrazem jest węższa specyficzność substratowa w porównaniu do transporterów ABC z grzybów czy ssaków. Przykładem takiego białka jest badany w grupie profesora Michała Jasińskiego transporter ABCG46 z *Medicago truncatula,* modelowej rośliny bobowatej. Wcześniejsze eksperymenty wykazały, że fizjologiczną funkcją białka MtABCG46 jest transport dwóch metabolitów ze szlaku fenylopropanoidowego, tj. kwasu *para*-kumarowego oraz likwiritigeniny. Co ciekawe, MtABCG46 nie transportuje innych metabolitów o podobnej strukturze chemicznej, takich jak izolikwiritigenina i 7,4'dihydroksyflawon.

Głównym celem pracy doktorskiej mgra inż. Konrada Pakuły było zbadanie molekularnych podstaw selektywnego transportu fenylopropanoidów przez MtABCG46.

Drugim, nie mniej ważnym, celem pracy było sprawdzenie czy istnieje korelacja między wzrostem aktywności ATPazowej frakcji błonowej zawierającej badany transporter z rodziny ABCG a obecnością transportowanej substancji. Udowodnienie takiej zależności pozwoliłoby na dużo łatwiejszą identyfikację substratów dla transporterów ABC.

Korzystając z niedawno opublikowanych struktur transporterów ABC oraz szeregu narzędzi bioinformatycznych, doktorant rozpoczął swoją pracę od stworzenia hipotetycznego modelu struktury MtABCG46. Uzyskany model przewiduje obecność tunelu zbudowanego z transbłonowych helis nr 2, 5, 8 i 11, prowadzącego do kieszeni centralnej, która stanowi potencjalne miejsce wiązania substratu. Następnie w oparciu o mapowanie reszt aminokwasowych tworzących powierzchnię obu elementów strukturalnych oraz dane filogenetyczne wytypowano do dalszej analizy resztę fenyloalaniny w pozycji 562, która jest silnie zachowana u zwierzęcych ortologów ABCG (np. F431 u ludzkiego ortologa HsABCG2 o znanej strukturze), ale wysoce zmienna u roślin kwiatowych. Dodatkowo analizie poddano resztę tyrozyny w pozycji 1213 (Y1213), która odpowiada pozycji F431’ w drugiej połówce homodimeru HsABCG2. Heterologiczna ekspresja wariantów białka MtABCG46 w pozycjach 562 i 1213 oraz eksperymenty transportu in vitro wybranych fenylopropanoidów potwierdziły, że obie reszty F562 i Y1213 są istotne dla funkcji transportowej MtABCG46, przy czym zamiana F562 na resztę leucyny powoduje utratę zdolności do transportu kwasu *para*-kumarowego przez MtABCG46, przy zachowaniu pełnej aktywności transportowej względem likwiritigeniny. Co ciekawe, transport likwiritigeniny przez wariant F562L był nadal hamowany przez kwas para-kumarynowy, mimo że nie jest on transportowany przez ten wariant. Sugeruje to, że transport metabolitów przez MtABCG46 jest wieloetapowy i wymaga dalszych szczegółowych badań.

W kolejnym etapie badań doktorant posłużył się modelami strukturalnymi białka MtABCG46 uzyskanymi przy pomocy algorytmu AlphaFold2. Nowy model białka MtABCG46 nazwany AF2 różnił się od poprzedniej wersji, uzyskanej przy pomocy serwera I-TASSER, mniejszymi rozmiarami kieszeni centralnej oraz dużo węższym wejściem do tunelu od strony cytozolowej. Model AF2 następnie posłużył do dokładniejszego wyznaczenia tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej w oparciu o zaawansowane techniki modelowania molekularnego. Zgodnie z oczekiwaniami droga prowadząca do kieszeni centralnej była bardzo trudno dostępna dla izolikwiritigeniny i 7,4’dihydroksyflawonu, które nie są transportowane przez białko MtABCG46. W

przypadku modeli niefunkcjonalnych wariantów F562Y i F562A zaobserwowano zwężenie tunelu, zwłaszcza w okolicy wejścia do tunelu, co prawdopodobnie uniemożliwia dostęp wszystkich analizowanych fenylopropanoidów do kieszeni centralnej. Kolejne analizy wskazały, że podstawienia F562Y i F562A prawdopodobnie skutkują przemieszczeniem helisy transbłonowej nr 5, co w konsekwencji prowadzi do znaczącej zmiany struktury kieszeni centralnej oraz prowadzącego do niej tunelu. W przypadku wariantu F562L struktura tunelu była podobna do formy dzikiej białka MtABCG46. Powyższe analizy nie pozwoliły jednak wyjaśnić dlaczego wariant F562L nie transportuje kwasu *para*-kumarowego.

Po przeczytaniu tej części wyników i odnoszącej się do niej dyskusji nasunęły mi się następujące pytania:

- czy były robione próby dokowania molekularnego in silico kwasu *para*-kumarowego oraz likwiritigeniny do kieszeni centralnej MtABCG46 oraz wariantu F562L,
- biorąc pod uwagę strukturę chemiczną kwasu *para*-kumarowego i likwiritigeniny, do jakich oddziaływań chemicznych może dochodzić między cząsteczkami substratów a łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych w obrębie kieszeni centralnej,
- zakładając, że przejście przez tunel do kieszeni centralnej jest niedostępne dla izolikwiritigeniny i 7,4'dihydroksyflawonu z powodu barier energetycznych, czy możliwe jest rozszerzenie zakresu transportowanych fenylopropanoidów przez białko MtABCG46 dzięki poszerzeniu tunelu na drodze mutagenezy ukierunkowanej genu *MtABCG46* w oparciu o analizy porównawcze sekwencji i struktur białek ABCG oraz techniki dynamiki molekularnej,
- który szczegół budowy strukturalnej cząsteczki likwiritigeniny, nie występujący w izolikwiritigeninie i 7,4'dihydroksyflawonie, może determinować łatwiejsze wejście tej cząsteczki do tunelu w białku MtABCG46?
- czy była próba stworzenia wariantu F562V białka MtABCG46? Reszta waliny w pozycji odpowiadającej F562 u MtABCG46 występuje u ortologów ABCG46 z zielenic i ma podobną do reszty leucyny strukturę łańcucha bocznego. Jestem ciekawy jaki byłby efekty fenotypowy takiej zamiany i czy modelowanie molekularne takiego wariantu wykazałoby zmiany w strukturze tunelu i kieszeni centralnej?

W drugiej części pracy doktorant wykazał dla dwóch znanych substratów transportera ABCG36 z *Arabidopsis thaliana*, tj. kamaleksyny i kwasu indolilo-3-masłowego, oraz dla likwiritigeniny i transportera MtABCG46 zależność wzrostu aktywności ATPazowej transporterów ABCG od obecności transportowanej substancji.

Niestety w przypadku dodania kwasu *para*-kumarowego do frakcji błon z białkiem MtABCG46 nie zaobserwowano wyższej od kontroli aktywności ATPazowej. Wyniki ten sugeruje, że nie dla każdej substancji transportowej przez białko z rodziny ABC można wykazać stymulację aktywności ATPazowej, co miałoby być pośrednim, ale też rozstrzygającym dowodem na to, że dana substancja jest substratem dla badanego transportera. Zastanawiam się jednak czy negatywny wynik uzyskany dla kwasu *para*-kumarowego i MtABCG46 nie jest spowodowany warunkami eksperymentu. Pomiary transportu kwasu *para*-kumarowego i likwiritigeniny wykonywane były przy prawie dwudziestokrotnie większym stężeniu substratów (750 μM vs. 40 μM). Być może wzrost aktywności ATPazowej MtABCG46 mógłby być zaobserwowany przy dużo wyższym stężeniu kwasu *para*-kumarowego. Ponadto interesującym uzupełnieniem byłoby zbadanie czy obecność kwasu *para*-kumarowego w stężeniu 40 μM hamowałaby aktywność ATPazową MtABCG46 stymulowaną przez likwiritigeninę. Podobny eksperyment mógłby być wykonany także dla wariantu F562L. Dobrze by było sprawdzić czy w warunkach eksperymentalnych zastosowanych do pomiarów aktywności ATPazowej białka MtABCG46 jest równocześnie wykrywany transport kwasu *para*-kumarowego do pęcherzyków.

Jestem ciekawy poglądu doktoranta na temat znaczenia fizjologicznego transportu kwasu *para*-kumarowego i likwiritigeniny przez białko MtABCG46. W jakich stężeniach występują te metabolity w komórkach roślin? Czy oba związki są jednakowo dobrze transportowane przez białko MtABCG46? Czy może tylko jeden z nich jest *bone fide* substratem białka MtABCG46? Co ciekawe, wcześniejsze badania wykazały, że ekspresja genu *MtABCG46* w korzeniach *M. truncatula* wzrasta kilkukrotnie po dodaniu kwasu *para*-kumarowego, a po podaniu likwiritigeniny wzrost był niewielki (Biała i wsp., *J. Exp. Biol.*, 2017). O czym to może świadczyć w kontekście specyficzności substratowej MtABCG46 i jego funkcji fizjologicznej? Na koniec chciałbym poznać opinię doktoranta jak należy rozumieć specyficzność substratową transportera MtABCG46. Czy białko MtABCG46 transportuje tylko dwa spośród kilku metabolitów szlaku fenylopropanoidowego? Czy transporter MtABCG46 jest specyficzny wobec dwóch metabolitów endogennych? Czy jedynymi związkami transportowanymi przez białko MtABCG46 są kwas *para*-kumarowy i likwiritigenina?

Podsumowując tę część oceny rozprawy doktorskiej mgra inż. Konrada Pakuły, uważam, że doktorant w pełni zrealizował postawione przez siebie cele badawcze, uzyskał wiele nowych i interesujących danych naukowych, które w znaczący sposób

pogłębiły wiedzę na temat molekularnych mechanizmów transportu przez roślinne białka z rodziny ABCG, a jednocześnie wyznaczyły nowe kierunki badań w tej dziedzinie. Warte podkreślenia jest zastosowanie interdyscyplinarnego podejścia badawczego obejmującego analizy bioinformatyczne, modelowanie molekularne oraz klasyczne techniki biologii molekularnej i biochemii.

Uwagi dotyczące terminologii i edycji tekstu rozprawy

1. W całym tekście rozprawy doktorant zamiast terminu reszta aminokwasowa w kontekście polipeptydu używa terminu aminokwas czy też nazwy poszczególnych aminokwasów, np. reszta fenyloalaniny (albo zgodnie z nomenklaturą chemiczną reszta fenyloalanylowa) w pozycji 562, a nie fenyloalanina 562 (str. 76).
2. Należałoby unikać stosowania nomenklatury genetycznej do opisu białek, np. podstawienia bądź zamiany kluczowych reszt aminokwasowych, a nie mutacje kluczowych aminokwasów (str. 16), zamiast „warianty *pen3-5* oraz *pen3-6* posiadają pojedyncze substytucje, kolejno L704F oraz A1357V" (str. 33) poprawnie byłoby „mutanty *pen3-5* oraz *pen3-6* posiadają pojedyncze podstawienia reszt aminokwasowych, kolejno L704F oraz A1357V", gdyż w języku polskim w biologii termin „substytucja" oznacza typ mutacji genowej. Lepiej byłoby pisać o wariantach białkowych niż o mutantach białkowych, ale w literaturze utarł się już termin „mutant białkowy" (*mutant protein*) czyli białko kodowane przez zmutowany gen.
3. Zauważyłem w tekście rozprawy brak konsekwencji w wyjaśnianiu skrótów, np. nie wszystkie stosowane skróty są umieszczone w spisie (np. PMSF), niektóre skróty nie są wyjaśnione w miejscu pierwszego użycia (np. PVP), a tylko w spisie, inne skróty pozostawiono bez wyjaśnienia (np. 2,4-D).
4. Autor błędnie zapisał nazwy białek grzybowych wielkimi literami, np. PDR5 czy CDR1. Zgodnie z przyjętą nomenklaturą nazwy białek grzybowych składają się z trzech liter i cyfry, przy czym tylko pierwszą literę w nazwie piszemy wielką czcionką. Na końcu nazwy powinno się jeszcze dodawać literę „p", np. Pdr5p, ale od tej zasady coraz częściej odchodzi się w publikacjach.
5. W pracy w języku polskim cytując literaturę tradycyjnie stosuje się skrót „i in." czyli „i inni" lub „i wsp." czyli „i współpracownicy", a nie łacińskie „et al." jak w tekstach anglojęzycznych.

6. Zwyczajowo nieskrócone nazwy gatunków piszemy tylko przy pierwszym użyciu w tekście, a potem stosujemy skrót nazwy rodzajowej.
7. Zauważyłem dwie w tekście dwie kalki z języka angielskiego, np. przeznaczony, a nie dedykowany, zielenice, a nie zielone algi.
8. Autor nie ustrzegł się żargonowych sformułowań w rozdziale Materiały i metody, np. glicerolowe stoki bakterii, identyfikacja pozytywnych kolonii bakteryjnych, próby zworteksowano, pożywki autoklawowano, woda MQ.
9. Często brakuje spacji między wartością liczbową a symbolem miary.
10. Zauważyłem błędne użycie słowa „ilość" zamiast „liczba" w stosunku do rzeczowników policzalnych, np. w streszczeniu w miejsce „zwiększenie ilości genów" powinno być „zwiększenie liczby genów".
11. Częstotliwość to liczba cykli czy zdarzeń określonego zjawiska, które zaszły w danym okresie czasu, zatem powinna być częstość, a nie częstotliwość występowania reszt aminokwasowych w danej pozycji polipeptydu (np. Ryc. 4.6, str. 78);
12. Doktorant nie ustrzegł się też literówek i licznych błędów interpunkcyjnych.

Inne uwagi:

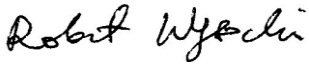
1. Źródło pochodzenia podano tylko dla niektórych odczynników (rozdz. Materiały i metody).
2. Brak opisu wektora pMDC43 (str. 38).
3. Nie podano w jakim rozcieńczeniu używano przeciwciał anty-AtABCG36 w analizie Western blot (str. 48).
4. W składzie buforu do zawieszania frakcji błonowej (Tab. 2.8, str. 50) dwukrotnie wymieniono sacharozę w stężeniach końcowych 0,33 M i 10%.
5. Brak informacji z jakich gatunków pochodzą analizowane sekwencje roślinnych ortologów w Tabeli 4.2 (str. 78). Ponadto dla wszystkich sekwencji powinny być podane numery identyfikacyjne z odpowiednich baz danych. W panelu b Tabeli 4.2 łacińskie nazwy gatunkowe powinny być zapisane kursywą.
6. Zauważyłem również brak konsekwencji w nazwach grup filogenetycznych (str. 62, 77 i 78). Zamiast „zielone algi, Bryophytes, Pteridophytes, jednoliścienne i dwuliścienne", powinno być „zielenice, mszaki (albo mchy), paprotniki, jednoliścienne i dwuliścienne" albo *„Chlorophyta*, *Bryophyta*, itd.". Ponadto

paprotniki to historyczny takson i obecnie taksonomia wyróżnia widłaki (*Lycopodiophyta*) i paprocie (*Polypodiophyta*). Czy w przypadku Bryophytes chodziło o historyczny takson mszaków obejmujący glewiki, wątrobowce i mchy, czy tylko mchy? Czy w analizie uwzględniono ortologii MtABCG46 z roślin nagonasiennych?

Powyższe uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę merytoryczną pracy, ale przedstawiam je wywiązując się z obowiązków recenzenta w nadziei, że pozwolą one doktorantowi na uniknięcie powyższych błędów podczas edycji przyszłych tekstów naukowych.

Wniosek końcowy

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.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr. inż. Konrada Pakuły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Prof. dr hab. Robert Wysocki