



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

Zakład Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali u Roślin

prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

d.antosiewicz@uw.edu.pl

tel: 22-5542105

Warszawa, 15.11.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. **Konrada Mateusza Pakuły**
pt: „**Molekularne podstawy selektywnego transportu fenylopropanoidów**
przez białko ABCG46 z *Medicago truncatula*”

promotor: **prof. dr hab. Michał Jasiński**
promotor pomocniczy: **dr Jacek Kolanowski**

1. Znaczenie podjętego tematu

Białka transportujące z rodziny ABC (ATP Binding Cassette proteins) są zaangażowane w przenoszenie przez błony biologiczne dużych molekuł (w tym hormonów, cząsteczek sygnałowych, różnego rodzaju metabolitów wtórnych), stanowią więc jedną z kluczowych grup transporterów odpowiedzialnych za prawidłowy wzrost i rozwój roślin. Mechanizmy włączone w regulację efektywności transportu są jednak poznane tylko w niewielkim stopniu, szczególnie podstawy molekularne warunkujące specyficzność substratową w powiązaniu ze strukturą białka. Duże znaczenie poznawcze tematyki podjętej w niniejszej rozprawie doktorskiej polega na udziale w wypełnieniu tej luki w wiedzy. CELEM badań było wskazanie determinant strukturalnych białka ABCG46 z *Medicago truncatula*, odpowiedzialnych za selektywne przenoszenie dwóch substratów: likwiritigeniny i kwasu *para*-kumarowego.

2. Charakterystyka pracy i uzyskanych wyników

Rozprawa doktorska licząca 134 strony (bez załączników) jest podzielona na pięć rozdziałów głównych, które poprzedzono Streszczeniem, Wykazem Skrótów oraz informacjami o finansowaniu badań i publikacjach powstałych w ramach pracy doktorskiej. Na końcu rozprawy zamieszczono Bibliografię i Załączniki (trzy pozycje) oraz powtórzenie wykazu publikacji.

We WSTĘPIE liczącym 27 stron omówiono w sposób zwięzły i zrozumiały budowę i funkcję białek ABC w organizmach z różnych królestw. Jego układ jest dobrze przemyślany i nieprzeładowany szczegółami. W dwóch ostatnich podrozdziałach przedstawiono bardziej szczegółowo transportery ABCG, stopniowo przechodząc do roślin i do zagadnienia specyficzności substratowej, a na końcu do białka ABCG46 z *Medicago truncatula*, będącego przedmiotem badań. Szkoda, że WSTĘP nie kończy się postawieniem pytań, na które autor pracy doktorskiej chce odpowiedzieć, a następnie przejściem do zaprezentowania CELU pracy. Cel i realizowane zadania badawcze są podane niestety dopiero po opisaniu MATERIAŁÓW i METOD. Z tego względu, czytając MiM w zasadzie nie wiadomo na jakie pytania autor będzie chciał odpowiedzieć. Taka kolejność podawania informacji czyni pierwszą część rozprawy mniej klarowną. Dobrze, że na jej początku zamieszczono Streszczenie.

Wysoko oceniam podjęcie trudnego do realizacji wyzwania naukowego i otrzymane wyniki. Prac w tym obszarze jest bardzo mało. Badania przedstawione w rozprawie prowadzą do identyfikacji aminokwasów kluczowych dla specyficzności substratowej zlokalizowanego w błonie komórkowej białka MtABCG46, przenoszącego poza komórkę likwiritigeninę i kwas *p*-kumarowy. Oba substraty to molekuły ze szlaku fenylopropanoidów, ważnego w biosyntezie między innymi lignin, flawonoidów czy fitoaleksyn.

Otrzymano nowe, bardzo ciekawe wyniki, a sukces badań wynikał z kilku czynników.

Po pierwsze – z dobrego podejścia metodycznego. Zastosowano wiele różnorodnych, dobrze dobranych, uzupełniających się metod: (i) molekularnych (w tym mutageniza, transformacja komórek kultur kalusa tytoniu BY2, sekwencjonowanie), (ii) biochemicznych (w tym Western, identyfikacja lokalizacji subkomórkowej z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego, analiza transportu w oparciu o pęcherzyki błonowe; HPLC/MS, testy aktywności ATPazowej), (iii) bioinformatycznych i metod analiz *in silico* z włączeniem dynamiki molekularnej (w tym jpred, GREMLIN, Pymol, AlphaFold 2, I-TASSER, CAVER 3, TransportTools, CaverDock).

Po drugie, z dobrze zaplanowanej struktury badań, o logicznej kolejności doświadczeń. I tak, punktem wyjścia były analizy *in silico*, aby przy udziale narzędzi dostępnych na początkowym etapie prac (I-TASSER), wygenerować trójwymiarową strukturę MtABCG46, w oparciu o którą wskazano aminokwasy potencjalnie kluczowe w nadawaniu specyficzności substratowej.

W wygenerowanym modelu zidentyfikowano ważne dla transportu elementy strukturalne: kieszeń centralną (tworzoną przez cztery helisy transbłonowe 2, 5, 8, 11) i prowadzący do niej tunel. Z kolei w kieszeni – wskazano na dwa aminokwasy (Fenyloalanina na pozycji 562 i tyrozyna na pozycji 1213; F562 i Y1213), których znaczenie dla specyficzności substratowej transportera badano w dalszym przebiegu prac. Dla określenia ich funkcji w aktywności przenośnikowej białka, wykonano celowaną mutagenezę, zamieniając F562 i Y1213 na aminokwasy najczęściej występujące na tych pozycjach w białkach innych roślin. Podejście to uważam za merytorycznie uzasadnione. Badane aminokwasy to F562 (wykonano modyfikacje F562Y, F562L, F562I i F562A) i Y1213 (modyfikowana do Y1213F i Y1213A).

Następnie przeprowadzono kompleksowe, uzupełniające się badania aby określić rolę F562 (i w mniejszym zakresie Y1213) w selektywnym transporcie substratów - likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego: (i) eksperymenty determinujące selektywność pobierania zależnego od białka natywnego i wariantów zmodyfikowanych; (ii) analizy *in silico*, z zastosowaniem metod dynamiki molekularnej, aby przyporządkować zależnym od modyfikacji zmianom w transporcie, zmiany struktury białka.

Co także ważne, eksperymenty zaplanowano tak, aby dany wynik był weryfikowany różnymi metodami. Dla przykładu; (i) weryfikacja zależności specyficzności substratowej MtABCG46 od F562 – poprzez porównanie wariantów MtABCG46 z celowaną mutagenezę pod względem rodzaju przenoszonych cząsteczek, transportu kompetycyjnego, struktury przestrzennej (głównie wielkości i struktury kieszeni centralnej i kanału), możliwości dotarcia substratów do kieszeni; (ii) porównanie modeli MtABCG46 otrzymanych przy użyciu dwóch narzędzi: I-TASSER i AlphaFold2.

Ważny wkład w powstanie pracy miała współpraca naukowa z Uniwersytetem A. Mickiewicza w Poznaniu, dzięki której rozszerzono zakres metodyczny badań o symulacje dynamiki molekularnej, a także z Uniwersytetem we Fryburgu, Szwajcaria (testy aktywności ATPazy dla detekcji potencjalnych substratów).

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej zaliczam:

- Wygenerowanie modelu przestrzennej struktury białka MtABCG46, zweryfikowanego poprzez użycie do tego celu dwóch narzędzi (I-TASSER i AlphaFold2),
- Wykazanie roli kieszeni centralnej i prowadzącego do niej tunelu w specyficznym substratowo transporcie likwiritigeniny i kwasu *p*-kumarowego przez białko MtABCG46, wskazanie, że zwężenie tunelu wynikające z modyfikacji F562 (F562Y i F562A) to jeden z czynników warunkujących specyfikę substratową (selekcja substratów na wstępnym etapie transportu),
- Wykazanie, że modyfikacja F562L zmienia specyficzność substratową (eliminuje zdolność do przenoszenia kwasu *p*-kumarowego przy zachowaniu transportu likwiritigeniny), pozostałe mutacje (F562Y, F562A, F562I) eliminują zdolność przenoszenia obu substratów przez białko MtABCG46,

Otrzymane wyniki oceniam jako nowe, oryginalne i wartościowe dla poznania mechanizmów odpowiedzialnych za transport prowadzony przez białka z rodziny ABCG. Przyczynią się do lepszego

rozumienia mechanizmów molekularnych warunkujących przenoszenie specyficznych substratów przez te białka przENOŚnikowe. Wykonane w ramach pracy doktorskiej pionierskie badania zależności struktura-funkcja MtABCG46 doprowadziły do ważnych ustaleń, jednocześnie otwierając wiele kolejnych ścieżek dla dalszych prac.

Rozprawę kończy rozdział **DYSKUSJA**, w którym na 10 stronach mgr inż. Pakuła omówił swoje najważniejsze osiągnięcia naukowe, przedstawiając je na tle literatury i uzasadniając wyciągnięte wnioski, jednocześnie wskazując na wiele wątków wymagających wykonania kolejnych doświadczeń dla określenia ich znaczenia w regulacji transportu oraz specyficzności substratowej. Rzetelne i krytyczne omówienie wyników wskazuje na dużą wiedzę Doktoranta i umiejętność spojrzenia na własne badania z dystansem. Z pracy jasno wynika, że poczynione ustalenia to początek badań nad transportem zależnym od MtABCG46, a jednocześnie nad charakterystyką rodziny białek ABCG.

Przeprowadzone badania są bardzo ciekawe, nowatorskie, dotyczą analiz bardzo słabo poznanych struktur i procesów. Jednak tekst w kilku miejscach pozostaje niejasny. I tak:

(1) W momencie rozpoczynania badań, jedynymi dostępnymi strukturami białek ABCG były ludzkie połowiczne transporterzy ABCG takie jak ABCG5/G8 i ABCG2. Założono, iż te struktury mogą być wykorzystane do modelowania *in silico* roślinnego białka MtABCG46. Podstawą tego założenia były analizy struktury drugorzędowej oparte o zbiór 1856 sekwencji pełnych roślinnych transporterów ABCG, które wykazały, iż ta grupa białek wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do wspomnianych ludzkich połowicznych transporterów ABCG. Doceniam ten punkt wyjścia i takie podejście metodologiczne, jednak uważam, że ten etap badań, kluczowy dla całej pracy, został omówiony zbyt powierzchownie. Określenia „wysokie podobieństwo”, bez uzasadnienia, określenia co to konkretnie oznacza, to za mało. Na potwierdzenie wniosków Doktorant przedstawił tylko dane w Zał.1, oraz topologie MtABCG46 na Ryc. 4.1 (w zasadzie bez szczegółowego komentarza, str.72). Brakuje mi: (i) po pierwsze zamieszczenia także innych wyników – np. dotyczących ABCG5/G8, a nie tylko dla ABCG2 (szczególnie, że modele MtABCG46 nałożono na strukturę ABCG5/G8, str. 73-74); (ii) bardziej szczegółowego komentarza do wyników prezentowanych w Zał.1 (w odniesieniu do opisu zamieszczonego na str. 71 pracy) – obejmującego zarówno podobieństwa jak i różnice (np. jakich domen dotyczą, czy są jakieś specyficzne domeny, które warto wskazać, itp.). To ważny początek badań, zatem dane w oparciu o które prowadzono kolejne analizy powinny być szczegółowo przedstawione, a co bardzo ważne – także skomentowane.

(2) Wyniki pierwszego etapu badań wskazywały na istnienie jednego tunelu prowadzącego do kieszeni centralnej. W późniejszym etapie sprawdzano, czy tuneli jest więcej (str. 90). Poza informacją, że analizy przy zastosowaniu narzędzi CAVER 3.0 oraz TransportTools uwidocznily rozbudowaną sieć połączeń z różnych obszarów komórkowych – nie pokazano tego wyniku, a kolejne badania (symulacje dynamiki molekularnej) weryfikują znaczenie wykrytych tuneli. Powinny zostać pokazane – np. graficznie, z zaznaczeniem, które warianty zostały wybrane do dalszych analiz.

(3) Uważam opis wyniku na str. 90 (5-10 wiersz od góry) za zbyt ogólny. Nie wskazano jaki sens ma wskazanie, że likwiritigenina akumuluje się „w warstwie pomiędzy głowami a ogonami fosfolipidów tworzących błonę” (ryc. 4.15) – biorąc pod uwagę integralną budowę cząsteczki fosfolipidów (hydrofilowa głowa i hydrofobowe łańcuchy składające się na ogon). Aby przejść dalej, ten wynik powinien być skomentowany pod względem wskazania znaczenia funkcjonalnego w badanym procesie specyficzności substratowej MtABCG46 (brakuje mi odniesienia wprost do informacji podanych na str. 90, wiersze 3-5). Białko MtABCG46 przenosi substraty z wnętrza komórki poza błonę komórkową – jakie zatem może mieć znaczenie analiza tuneli prowadzących z obszaru błony komórkowej. To ważne w pracy zagadnienie nie zostało jasno przedstawione i opisane, nie wiadomo jaki jest stosunek autora pracy doktorskiej do tego zagadnienia. Krótkie odniesienie do ryc. 4.16 na str. 90 niewiele wyjaśnia, ponieważ ani legenda do ryciny 4.16 nie jest wystarczająco precyzyjna, ani opis w tekście.

(4) Całkowity brak komentarza do wyników pokazanych w zał.3 (str. 91). Uważam, że poza stwierdzeniem „brak znaczących różnic w stabilności mutantów w porównaniu do natywnego białka” powinno się chociaż w 2-3 zdaniach wskazać co zrobiono, jakimi metodami i jaki jest wynik.

(5) Rozdział 4.5.5 uważam w całości za źle napisany. Opis jest za mało zrozumiały – autor nawiązuje do poprzednich wyników, jednak tylko słownie - trzeba się domyślać co i skąd zostało użyte do porównania. Brak odniesień do konkretnych danych, rycin tabel. Rycina 4.21 (cytowana w tekście) nie została prawidłowo opisana i nie wnosi wielu czytelnych informacji.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca została napisana poprawnym naukowym językiem, zasadniczo bez stosowania tzw. żargonu laboratoryjnego. Czyta się ją dobrze, a zamieszczone grafika (tabele, ryciny) pomaga w zrozumieniu przekazu. Jednak legenda do rycin i tabel nie zawsze jest zgodna z zasadą podania wszystkich szczegółów umożliwiających śledzenie zawartych informacji (ang. „self-explanatory”).

Rycina 4.4. (str. 75) – legenda zawiera błędy w oznaczeniach w 3ciej i 4tej linii opisu.

Tabela 4.1: Opis Tabeli zbyt ogólny, niepełny, nie podano zakresu numerów aac w pozywanych helisach, nie wyjaśniono zasady łączenia odpowiadających sobie par aac tworzących pary powiązane koewolucyjnie. *Poza tym:*

(i) Opis niezgodny z głównym przesłaniem, iż numery pozycji w Tabeli 4.1 to aac wstępnie wyselekcjonowane - brak zaznaczonego numeru Y1213 (aac wybrany do dalszych badań).

(ii) Przydałoby się też dla jasności przekazu w Tabeli 4.1 oznaczyć numerami wszystkie aac omawiane w tekście poniżej. Aby śledzić tok rozumowania / opisy wyników – trzeba sobie odliczać i zaznaczać ołówkiem w pracy pozycje omawiane w tekście (np. F570, F1218, N1331).

(iii) Z kolei, aac zaznaczone numerami (kandydaci) nie są w ogóle omówione w tekście (poza F562), nie wiadomo zatem jak są postrzegane przez autora rozprawy doktorskiej, dlaczego zostały zaznaczone a potem już nie zostały uwzględnione w analizach. Dane te powinny zostać omówione z podaniem ich potencjalnego znaczenia w transporcie i powodów, dla których nie zostały w pracy analizowane pod względem znaczenia w nadawaniu specyficzności substratowej transportera.

Rycina 4.12. (str. 86) – legenda nieprecyzyjna: rycina nie przedstawia „Transportu kompetycyjnego likwiritigeniny i kwasu p-kumarowego”, a „Transport kompetycyjny likwiritigeniny w obecności kwasu p-kumarowego” lub „Kompetycyjne działanie kwasu p-kumarowego na transport likwiritigeniny”. Poza tym -- następne zdanie zaczynające się od „Przedstawione wartości to” powinno zostać uzupełnione informacją:w warunkach kontrolnych oraz w obecności związku kompetycyjnego kwasu p-kumarowego [podać stężenie kwasu...].

Rycina 4.14. (str. 89) – na grafice nie zaznaczono (np. nie wskazano strzałką lub innym oznaczeniem graficznym) obszaru gdzie jest kieszeń. To należy do kanonu precyzyjnego opisu i przedstawiania wyników.

Rycina 4.15. (str. 90) – nieprawidłowy opis części (a) ryciny. W zasadzie nie napisano co prezentuje grafika w (a), jedynie podano co zaznaczono zieloną kulką ????. Brak prawidłowych oznaczeń, brak odniesienia do pokazanych elementów, powinno się je wskazać np. strzałkami czy innymi elementami graficznymi, a w legendzie podać co one oznaczają.

Rycina 4.16. (str. 91) – opis grafiki całkowicie nieczytelny, część (a) brak wskazania elementów strukturalnych na grafice – tunele, brak opisu; część (b) – czy to tunel zidentyfikowany jako zajmujący ok 9% czasu symulacji? Jeżeli tak – to na str. 90 powinno być odniesienie do „ryc. 4.16b” Jaka jest relacja pomiędzy częścią (a) i (b)?

Rycina 4.17. (str. 92) – w legendzie napisano: Wpływ modyfikacji na tunel; zabrakło podania co było modyfikowane. W części (b) pokazano dane z inną skalą n osi „y” – jednak dla promieni w zakresie 0.95 – 1.05 powinno się także pokazać wartości dla ABCG46 i F562L przerywając słupki i podając wartości powyżej. Poza tym wartości dla F562Y i F562A są inne niż w części (a) ???

Rycina 4.21. (str. 97) –niejasny opis ryciny, brak oznaczeń na grafice – trzeba się domyślać co na niej autor pokazał. Wpływ modyfikacji ... czego ? ...; Skąd ta struktura? Skąd F684? Nie wiadomo co pokazują elementy graficzne a-d. Obowiązkiem autora jest precyzyjne wyjaśnienie co pokazuje i przyjęcie takich dodatkowych oznaczeń (wyjaśnionych w legendzie) żeby bez żadnych wątpliwości śledzić jego tok myślenia.

Wymienione komentarze i uwagi krytyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny wartości naukowej pracy doktorskiej. Przedstawiono szereg interesujących, nowych i ważnych wyników wnoszących istotny wkład w zrozumienie regulacji specyficzności substratowej białek ABCG na przykładzie MtABCG46. Część danych została opublikowana z doktorantem jako współautorem (Journal of Biological Chemistry, 2020r.), kolejne dwie prace są w trakcie recenzji. Należy też podkreślić, że doświadczenia ze stymulacją aktywności ATPaz dla identyfikacji potencjalnych substratów dla białek ABCG zostały wykonane w ramach własnego grantu NCN PRELUDIUM (2021/41/N/NZ1/04030).

Wniosek końcowy:

Przedstawiona praca doktorska zawiera nowatorskie wyniki w istotny sposób poszerzające dotychczasowy stan wiedzy w zakresie molekularnych podstaw transportu i specyficzności substratowej białek ABCG u roślin. Otrzymane dane stanowią twórczy wkład w poznanie procesów warunkujących selektywny transport fenylopropanoidów w wyniku aktywności MtABCG46. Biorąc pod uwagę zaprezentowany oryginalny dorobek naukowy stwierdzam, że 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 z 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 Mateusza Pakuły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz