Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Niedziałkowskiej pt. „The influence of posttranslational modifications on interactions between histone H3 and Survivin"

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Recenzowana praca doktorska dotyczy strukturalnych podstaw rozpoznawania elementów chromatyny i kompleksu białkowego CPC (Chromosomal Passenger Complex), odpowiedzialnego za ochronę stabilności genomu poprzez koordynację z cytokinezą równej segregacji zduplikowanych chromosomów. W skład CPC wchodzi kinaza Aurora B i białka: Borealina, Surwiwina i INCENP. Prawidłowa segregacja chromosomów wymaga, by mikrotubule wychodzące z przeciwległych biegunów wrzeciona kariokinetycznego przyłączyły się jednocześnie do swoich rejonów wiązania na naprzeciwległych powierzchniach zduplikowanych chromosomów (tzw. kinetochorów), w celu ich odciągnięcia do przeciwnych biegunów komórki. W trakcie mitozy, CPC jest kierowany przez borealinę i surwiwinę do rejonu połączenia zduplikowanych chromosomów (tzw. wewnętrznego centromeru). Borealina przyłącza się do histonu H2A fosforylowanego na treoninie 120, natomiast surwiwina oddziałuje z histonem H3 fosforylowanym na treoninie 3 przez kinazę Haspin.

Doktorantka postawiła sobie w pracy za cel zbadanie podłoża molekularnego oddziaływania surwiwiny z histonem H3 w kontekście specyficzności kierowania PCP do wewnętrznego centromeru, a także ewentualnego znaczenia dla tej funkcji ważnych modyfikacji H3 – metylacji i acetylacji lizyny 4.

Ze względu na fundamentalne znacznie kontroli prawidłowej segregacji chromosomów dla normalnej proliferacji komórek, identyfikacja i szczegółowe rozpoznanie na gruncie strukturalnym właściwości biochemicznych i molekularnych podstaw specyfiki interakcji miedzy H3 i surwiwiną, mają nie tylko bardzo duże znaczenie poznawcze, ale otwierają także

drogę do wielu różnych badań, w tym także potencjalnie istotnych z punktu widzenia etiologii i terapii chorób, w szczególności o podłożu nowotworowym. Z tego powodu, tematykę rozprawy uznaję za wyjątkowo aktualną i nadzwyczaj ważną merytorycznie.

Szczegółowe cele rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

Doktorantka postawiła sobie, jako podstawowy cel rozprawy, wyjaśnienie na gruncie biochemicznym i biofizycznym specyfiki wiązania kompleksu CPC lub jego elementów z Xenopus i człowieka, do niezmodyfikowanego i zmodyfikowanego przez fosforylacje treoniny 3, N-końcowego fragmentu histonu H3. W szczególności, zamierzała analizować powinowactwo obu badanych interaktorów i zidentyfikować aminokwasy w surwiwinie, które odpowiadają oddziaływanie z H3 i rozpoznanie jego charakterystycznej modyfikacji poprzez fosforylację treoniny 3. Postanowiła również zbadać wpływ na to oddziaływanie temperatury i pH. Powyższe analizy miały na celu wyjaśnienie różnic w wiązaniu fragmentu H3 przez surwiwinę człowieka i Xenopus. Dodatkowym celem była próba wyjaśnienia roli w wiązaniu surwiwina-H3 potranslacyjnych modyfikacji lizyny 4 histonu H3.
Do realizacji powyższych zamierzeń zastosowała w pełni adekwatne, nowoczesne i skomplikowane techniki z zakresu genetyki i biologii molekularnej, biochemii białek, krystalizacji i analizy strukturalnej białek za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej, biofizycznych metod analizy oddziaływań białek oraz analiz bioinformatycznych.
Zastosowane w pracy metody doświadczalne były w pełni odpowiednie dla realizacji przyjętego przez doktorantkę podejścia badawczego.

Najważniejsze uzyskane wyniki

Rozprawa przedstawia rezultaty kilkudziesięciu obszernych, starannie zaplanowanych i poprawnie wykonanych doświadczeń. Najważniejsze uzyskane wyniki to:

1. Szczegółowa charakterystyka oddziaływań N-końcowego fragmentu histonu H3 i fragmentu kompleksu CPC z Xenopus, łącznie z wyznaczeniem stałej dysocjacji i udowodnieniem, że fosforylacja treoniny 3 w H3 wzmacnia siłę wiązania.
2. Ustalenie, na podstawie analizy krystalograficznej, atomowych determinant wiązania ludzkiej surwiwny i N-końca H3, z wykazaniem i potwierdzeniem za pomocą ukierunkowanej mutagenezy roli aminokwasów charakterystycznych dla białek z domeną BIR.

3. Wyjaśnienie różnic w powinowactwie do fosforylowanego na T3 histonu H3 pomiędzy surwiwiną ludzką i z Xenopus, odmiennym składem aminokwasowym obu surwiwin, w szczególności obecnością u Xenopus w konkretnym miejscu rejonu wiązania H3 argininy zamiast histydyny, jak u człowieka, oraz wynikającą stąd odmienną zależnością fosfospecyficzności obu surwiwin od pH.
4. Wykazanie, że w przeciwieństwie do metylacji lizyny 4 histonu H3, acetylacja tej lizyny zmniejsza siłę wiązania H3 z surwiwiną.

Znaczenie wyników

Wyniki uzyskane w przedstawionej rozprawie, przede wszystkim wykazanie roli fosforylacji treoniny 3 histonu H3 w wiązaniu się surwiwiny, wnoszą nowy i znaczący wkład w poznanie molekularnych podstaw specyficznego kierowania do centromerów kompleksów CPC, jednego z kluczowych stadiów w procesie prawidłowej segregacji chromosomów mitotycznych. Wykazanie zależności wiązania H3-surwiwina od pH oraz potencjalnego znaczenia dla siły wiązania modyfikacji potranslacyjnch lizyny 4 H3, otwiera nowe interesujące obszary badań nad możliwymi systemami regulacji tego procesu u różnych organizmów.

Komentarze i uwagi krytyczne

Nie mam istotnych zastrzeżeń do jakości przedstawionych wyników, ani do sposobu ich przedstawienia, który jest kompletny, wyczerpujący i jasny. Autorka wykazuje doskonałą orientację w literaturze naukowej, przy czym dotyczy to zarówno specjalistycznej tematyki pracy jak i jej szerszego biologicznego kontekstu, w szczególności w odniesieniu do zjawiska podziałów komórkowych i regulatorowej roli chromatyny. Dyskusja jest zwięzła, ale bardzo trafna i krytyczna, zwłaszcza w odniesieniu do proponowanych ogólniejszych modeli, jak na przykład ewentualnej regulacyjnej roli wewnątrzkomórkowego pH.

Autorce nie udało się oczyszczenie ludzkiego kompleksu CPC, zatem całość badań porównawczych musiała prowadzić posługując się wyłącznie jego fragmentem w postaci surwiwiny. Na str. 69 autorka odnosi się do zaobserwowanych w pomiarach za pomocą polaryzacji fluorescencji i ITC różnic w powinowactwie do H3 między izolowaną a połączoną w kompleksie CPC surwiwiną z Xenopus. Być może, jak pisze, jest to istotnie

tylko różnica wynikająca z odmiennych metod, ale zarówno w tym miejscu, jak i w Dyskusji brakuje mi obszerniejszego omówienia roli pozostałych elementów w wiązaniu surwiwiny do H3. Z jakich powodów autorka od początku nie zdecydowała się na badania nad izolowaną surwiwiną? Co do roli modyfikacji potranslacyjnych H3 innych niż fosforylacja treoniny 3 – czy nie ma przesłanek do badania nie tylko modyfikacji H3K4? Ciekaw jestem opinii autorki na ten temat. Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę jakości wykonania i merytorycznej zawartości rozprawy. Praca napisana jest poprawnym angielskim i jest przyjemna w czytaniu.

Wniosek końcowy:

Rozprawa zawiera poprawnie zaprojektowane i wykonane doświadczenia naukowe, w których uwzględniono wszystkie niezbędne kontrole. Wyniki są w pełni oryginalne i zawierają wyraźny element nowości naukowej. Zostały przedstawione w pracy w sposób kompletny i przejrzysty, a wnioski wyciągnięte na ich podstawie są w pełni uzasadnione. Najważniejsze osiągnięcia pracy zostały opublikowane w postaci dwóch prac naukowych, w Science (2010) i Mol. Biol. Cell (2012). Ze względu na powyższą opinię oraz na wyróżniającą się wysoką jakość merytoryczną rozprawy, wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego:

o dopuszczenie mgr Ewy Niedziałkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o rozważenie możliwości wyróżnienia jej rozprawy.

Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski

Warszawa, 08.04.2014