

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Akshay Maniyeri Suresh’a**

pt. „Regulation of cel envelope homeostasis by Lap proteins in *Escherichia coli*”

Praca doktorska mgr Akshay Maniyeri Suresh’a powstała pod opieką Prof. dr Satish’a Rainy w Pracowni Genetyki Bakterii na Wydziale Chemii Politechniki Gdańskiej. Promotor pracy to wybitny znawca procesów biogenezy lipopolisacharydu (LPS) i fosfolipidów (PL) osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Prace Profesora S. Rainy i jego zespołu badawczego wskazały na powiązania w syntezie tych dwóch składników błony zewnętrznej i błony komórkowej bakterii, w szczególności funkcji białek LapB i LapC w tych procesach. Doktorant podjął się kontynuacji tych badań. Celem jego pracy doktorskiej było uzyskanie wyników, które pogłębiłyby wiedzę na temat regulacji biosyntezy LPS u *E. coli*, w tym przede wszystkim pełniejszego wyjaśnienia roli białek LapC i LapD w kompleksie regulującym to zjawisko.

Rozprawa doktorska mgr Akshay Maniyeri Suresh’a stanowi opracowania typowe dla prac eksperymentalnych na stopień doktora. Obejmuje część teoretyczną – Wstęp, Cel i zakres pracy z jego uzasadnieniem, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, a także Wnioski i Spis literatury. Dołączono także Wykaz skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spisy rycin i tabel. W doktoracie znalazły się też 4 wieloautorskie publikacje, wszystkie z udziałem Doktoranta, wydane w *International Journal of Molecular Sciences*, w których zawarte są wyniki jego badań.

Doktorant w bardzo dobrze opracowanym Wstępie przedstawia przegląd informacji o osłonach komórek bakterii Gram-ujemnych. Szczególną uwagę poświęca błonie zewnętrznej (OM), w tym jej asymetrycznej budowie i roli jaką ona pełni, jako bariera przepuszczalności. Przedstawia też rolę białek błony zewnętrznej oraz ich biogenezę w wykorzystaniu kompleksu BAM (β -Barrel Assembly Machine). Opisano też znaczenie lipoprotein w integralności OM i innych jej właściwości. Scharakteryzowano proces biosyntezy fosfolipidów, a także ich przemieszczania z błony komórkowej do błony zewnętrznej przez system Lol. Duży fragment Wstępu poświęcono LPS, charakteryzując pod względem chemicznym i znaczenia biologicznego jego trzy regiony – lipid A (LA), region rdzeniowy i antygen-O. Szczegółowo przedstawiono biosyntezę regionu Kdo-LA wg szlaku Reatz'a, rolę białka FtsH i LapB w regulacji biosyntezy tego regionu oraz powiązania z biosyntezą PL. Jest ustalone, iż reszta kwasu 3-hydroksy-mirystynowego przyłączona do białka ACP (Acyl Carrier Protein) jest wspólnym substratem dla obu szlaków biosyntezy PL i regionu Kdo-LA LPS. Autor wskazał też na znacznie w procesie regulacji biosyntezy regionu Kdo-LA białka LapC. W następnym fragmencie Wstępu przedstawia też dalsze etapy tworzenia LPS, w tym rolę flipazy MsbA, przenoszącej LPS przez błonę komórkową do przestrzeni periplazmatycznej komórki bakterii i systemu białek Lpt (LPS transport) przenoszących LPS przez przestrzeń periplazmatyczną, pomiędzy błonami komórki bakterii Gram-ujemnych - błoną komórkową i błoną zewnętrzną. Przegląd informacji o LPS kończy charakterystyka glikoform regionu rdzeniowego *E. coli* oraz krótka informacji o znaczeniu biologicznym LPS jako endotoksyny.

Bardzo szeroko opisano także fosfolipidy bakterii Gram-ujemnych, ich miejsce błonie komórkowej oraz wewnętrznej części asymetrycznej błony zewnętrznej. Autor przedstawił szlak biosyntezy PL, od prekursorów szlaku tj. glicerolo-3 fosforanu i kwasów tłuszczowych. Szczegółowo opisano też szlak Mla odpowiedzialny za usuwanie niewłaściwie zlokalizowanych PL w błonie zewnętrznej i przemieszczanie ich do błony komórkowej. Krótko przedstawiono też budowę peptydoglikanu *E. coli* i etapy jego biosyntezy oraz przemieszczanie do periplazmy. Wstęp kończy rozdział poświęcony regulonowi σ^E i jego roli w biosyntezie LPS oraz PL i innych składników osłon komórkowych bakterii.

Stwierdzam, iż Wstęp jako część teoretycznej pracy doktorskiej został przygotowany właściwie. Zawiera przegląd danych dotyczących elementów ściany komórkowej bakterii, których biogeneza była przedmiotem badań Doktoranta. Zawarte w tekście informacje są uzupełnione przez ryciny obrazujące opisywane procesy i zjawiska. Ta część pracy ukazuje bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta do realizacji części doświadczalnej doktoratu.

Cel pracy doktorskiej mgr Akshay Maniyeri Suresh'a to pogłębienie wiedzy na temat regulacji biosyntezy LPS *E. coli*, w tym w szczególności pełniejszego wyjaśnienia roli białek LapC i LapD, oddziałujących z białkiem LapB, kluczowym białkiem w kontroli homeostazy tj. równowagi pomiędzy biosyntezą LPS, PL i innych składników ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Tak sformułowany cel badań został szczegółowo uzasadniony w kolejnym rozdziale rozprawy. Doktorant zwrócił m.in. uwagę na fakt, iż mechanizm jaki leży u podstaw modulującego działania LapB na FtsH i jak to wpływa na wytwarzanie LPS nie jest w pełni wyjaśnione. Także sieć białek działających w otoczeniu LapB jest prawdopodobnie bardziej rozbudowana niż obecnie wiadomo. Kluczowym było poznanie roli białka LapD które, biorąc pod uwagę jego interakcji z innymi białkami, na co wskazywało współcyszczanie, badania genetyczne, jego wyłączenie skutkujące zaburzeniami biosyntezy LPS i metabolizmu PL. Zastosowano także analizę supresorów pozagenowych dla wykazania funkcjonalnej sieci, w której działa LapD oraz wykorzystano wielokopijny supresor dla wskazania genów koniecznych do przezwycięzania defektów fenotypowych u bakterii z wyłączonym genem *lapD*. Równolegle analizowano konsekwencje braku funkcji białka LapC w systemie regulacji biosyntezy LPS. Wszystkie zadania badawcze właściwie uzasadniono, pokazując złożoność podjętych problemów związanych z biosyntezą LPS i PL oraz logiczne podejście do ich wyjaśniania. Różne podejścia badawcze zaplanowane do realizacji pracy doktorskiej przedstawiono na dwóch schematach na końcu części dysertacji z uzasadnieniem badań. Zaplanowane eksperymenty stanowiły podstawę realizacji zadań badawczych doktoratu.

W pracy Wykorzystano bogaty materiał badawczy - szczepy, plazmidy i oligonukleotydy, konieczne do realizacji zadań badawczych. Zestawiono je w tabelach,

podobnie podłoża hodowlane, jak i inne materiały (bufory, żele, roztwory i odczynniki chemiczne).

Metody badawcze ujęto w rozdziale 3.2. Zastosowano metody adekwatne do postawionych zadań badawczych. Zaprezentowano je szczegółowo i wyczerpująco. Podkreślić należy bogaty zestaw metod wykorzystanych w badaniach, w tym m.in. transformację i transdukcję bakterii, separację błony komórkowej i zewnętrznej, ekstrakcję LPS i jego analizę przy wykorzystaniu spektrometrii masowej, izolację i analizę kwasów tłuszczowych, oczyszczanie i analizę białek przy użyciu SDS-PAGE oraz Western blotting, a także metody genetyczne (delecji genów, ich klonowania, izolacji i mapowania ekstragenowych supresorów, mutacji transpozonowej).

Wyniki badań opracowano bardzo starannie i przedstawiono w tabelach i na rycinach. Wykorzystano także dane otrzymane od członków zespołu badawczego Promotora, co odnotowano w rozprawie. Do najważniejszych wyników rozprawy doktorskiej Doktoranta zliczyć należy m.in.:

1. Wykazanie koelucji białka LapD z innymi białkami zaangażowanymi w biogenezę LPS i jego transport oraz biosyntezę PL,
2. Stwierdzenie, iż w bakteriach z wyłączoną syntezą białka LapD ($\Delta lapD$) poziom białka LpxC spada w wyższej temperaturze,
3. Wykazanie, iż delecja w mutancie *lapD* genów *waaC* i *clsA*, odpowiednio kodujących białka WaaC (dołącza Hep do Kdo₂-LA) i ClsA (zaangażowane w syntezę kardiolipiny) powoduje zahamowanie wzrostu bakterii w wyższej temperaturze. To wskazuje na znaczenie białka LapD jako jednego z czynników koordynujących biogenezę LPS i homeostazę PL, co przekłada się na stabilność i funkcję OM u *E. coli*,
4. Wykazanie powiązania białka LapD z biosyntezą peptydoglikanu,
5. Wskazanie na rolę białka LapD w efektywnej translokacji LPS z błony komórkowej do błony zewnętrznej oraz biosyntezy PL,
6. Odkrycie funkcjonalnego związku pomiędzy białkami LapD i LapC.

Podsumowując, pragnę podkreślić, iż Doktorant zrealizował postawione cele pracy tj. pogłębienia wiedzy o roli białek LapD i LapC oddziałujących na białko LapB w

procesie regulacji biosyntezy LPS u *E. coli*. Autor dysertacji wskazał na rolę białek LapD i LapC jako czynników integrujących, spajający system regulujący Lap i na ich znaczenie dla utrzymania homeostazy struktur osłon zewnętrznych tych pałeczek Gram-ujemnych. Szczególnym osiągnięciem Mgr Akshay Maniyeri Suresh’a jest wykazanie, iż białko LapD jest w centrum funkcjonalnego kompleksu łączącego główne szlaki biogenezy błony komórkowej i ściany komórkowej *E. coli*. Jest powiązane z biosyntezą LPS i jego transportem do błony zewnętrznej bakterii, biosyntezą kwasów tłuszczowych i metabolizmem PL, a także biosyntezą peptydoglikanu. Doktorant odkrył te zależności, co pozwoliło mu zaproponować uzupełniony model regulacji biogenezy osłony komórkowej *E. coli* (ryc. 42), w tym syntezy w szczególności biosyntezy PL i LPS. W tym modelu, kompleks LapB/C/D jest w centrum tego systemu regulacji. Białko LapB poprzez białko FtsH degradowuje LpxC, hamując syntezę LPS. To pozwala na wykorzystanie kompleksu kwasu β -hydroksy-C14-ACP jako prekursora w syntezie PL, a białka LapD i LapC (jak to zaznaczono na tej rycinie) wpływają na oba sprzężone szlaki biosyntezy LPS i PL.

Dyskusja została przeprowadzona bardzo dobrze, tak w warstwie krytycznego spojrzenia na wyniki badań własnych, jak i w kontekście danych literaturowych. Szczegółowa analiza dużej liczby wyników odnoszących się do różnych procesów wskazuje na zdolności Doktoranta do szukania powiązań między nimi i wyciągania wniosków oraz uogólnień.

W rozdziale 15 przedstawiono Wnioski. Nie są tylko listą punktów z krótkimi sformułowaniami. Także tu Doktorant pokazał swoje zdolności do szerszego spojrzenia na swoje osiągnięcia. Stwierdzam, iż wnioski znajdują pełne potwierdzenie w uzyskanych wynikach.

Bogata jest dokumentacja pracy w formie rysunków, wykresów tabel i zdjęć. Rycin jest 42, a tabel 13. Ułatwiło to śledzenie opisu przeprowadzonych badań i ocenę uzyskanych wyników.

Bogata literatura w liczbie 320 pozycji jest dobrana dobrze i poprawnie cytowana.

Pragnę podkreślić widoczną pracowitość Doktoranta. Realizacja rozprawy zapewne wymagała od niej bardzo dobrej organizacji pracy i dużego zaangażowania. O innych jego cechach wspomniałem wyżej.

Praca doktorska mgr Akshay Maniyeri Suresh'a była dofinansowana ze grantu NCN. Jak napisałem wyżej wyniki badań Doktoranta znalazły się w publikacjach wydanych w renomowanym czasopiśmie naukowym. Znalazły więc już uznanie u wymagających recenzentów, co warto jest podkreślić.

Pytania i uwagi:

1. Na rycinach we Wstępie obrazujących osłony komórkowe *E. coli*, nie zaznaczono obecności peptydoglikanu w peryplazmie.
2. Na str. 104 Doktorant słusznie zauważa, iż jego wyniki badań mogą być w przyszłości wykorzystane w poszukiwaniu alternatywnych sposobów zwalczania bakterii Gram-ujemnych w czasach wzrastającej oporności bakterii na antybiotyki. Proszę o doprecyzowanie, co mogłoby być najwłaściwszym celem takich działań, w kontekście odkrytych mechanizmów regulacyjnych biosyntezy LPS, peptydoglikanu i fosfolipidów.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Akshay Maniyeri Suresh'a pt. „Regulation of cell envelope homeostasis by Lap proteins in *Escherichia coli*” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne tj. warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (D.U. z 2024. poz. 1571 z późn. zmianami) tj. prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Zwracam się więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 22.06.2026

