



Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 19.08.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Damiana Kołakowskiego

p.t.: “Charakterystyka i funkcja wybranych domen i motywu FFAT drożdżowego białka Vps13 i ludzkiej choreiny”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Kamińskiej
w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Kołakowskiego poświęcona jest badaniom drożdżowego białka Vps13 i jego ludzkiego odpowiednika, choreiny, będącej produktem genu *VPS13A*. W szczególności, Pan Kołakowski podjął się scharakteryzowania wybranych domen tych białek, ich oddziaływań z lipidami (zwłaszcza fosforanami fosfatydyloinozytolu), lokalizacji wewnątrzkomórkowej i funkcji w komórce. Głównym modelem badawczym w rozprawie są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, u których występuje jeden gen *VPS13*, w przeciwieństwie do organizmu człowieka z czterema genami *VPS13A, B, C, D*. Mutacje w ludzkich genach *VPS13* wywołują choroby, w tym np. rzadką chorobę neurologiczną, płasawico-akantocytozę (ang. chorea-acanthocytosis) wywołaną mutacjami w genie *VPS13A*. Białka z rodziny Vps13 są to duże (ponad 3000 aminokwasów), wielodomenowe cząsteczki zachowane w procesie ewolucji. Ich funkcje są nadal stosunkowo słabo poznane, choć wydaje się, że ich wielkość i liczne domeny determinują zaangażowanie w różne procesy komórkowe, w tym transport pęcherzykowy, autofagię, organizację cytoszkieletu czy tworzenie miejsc kontaktu błon (ang. membrane contact site, MCS) pomiędzy różnymi organellami. Zwłaszcza ta ostatnia funkcja, tj. tworzenie i działanie miejsc kontaktu błon, jest obecnie tematem intensywnych badań w dziedzinie biologii komórki na świecie. Duże rozmiary białek Vps13 utrudniają ich badania strukturalne, biochemiczne czy funkcjonalne, stąd analiza poszczególnych domen, zastosowana przez Pana Kołakowskiego, wydaje się uzasadnionym podejściem doświadczalnym. Zaprezentowane w rozprawie wyniki badań rzucają nowe światło na funkcje domen APT1 i PH-like oraz motywu FFAT białek Vps13. Stanowią ważny przyczynek do literatury przedmiotu, poszerzając naszą wiedzę o molekularnych i komórkowych mechanizmach działania białek z rodziny Vps13.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 106 stron maszynopisu jest napisana w języku polskim i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim. Wstęp (23 strony) zawiera 2 główne rozdziały. Po jednostronicowym przedstawieniu celu pracy następuje opis materiałów i metod (10 stron). Wyniki (40 stron) są

MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ W WARSZAWIE

ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa
secretariat@iimcb.gov.pl

tel.: (48 22) 597 07 00, fax: (48 22) 597 07 15
www.iimcb.gov.pl

podzielone na 3 podrozdziały. Dyskusja liczy 12 stron, po której następuje krótkie przedstawienie perspektyw dalszych badań oraz podsumowanie i wnioski. Rozprawa kończy się spisem literatury zawierającym 169 pozycji.

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy poświęcony jest dwóm grupom zagadnień, przedstawionym w kolejnych rozdziałach. Pierwszy rozdział jest bardzo dobrym omówieniem aktualnego stanu wiedzy dotyczącej genów *VPS13* i kodowanych przez nie białek, ich budowy, lokalizacji w komórce i procesów komórkowych od nich zależnych. W drugim rozdziale opisano regulację procesów komórkowych przez fosforany fosfatydyloinozytolu, w tym metody badania oddziaływań lipidów z białkami oraz charakterystykę oddziaływań fosforanów fosfatydyloinozytolu z białkami efektorowymi. We wstępie zamieszczono jedną tabelę i pięć schematycznych rycin, dobrze ilustrujących omawiane zagadnienia. Piśmiennictwo, na którym oparty jest wstęp, jest szerokie, obejmujące zarówno klasyczne pozycje opisujące identyfikację genów *VPS*, jak również najnowsze publikacje dotyczące białek z rodziny *Vps13*, także z bieżącego roku.

Wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do rozprawy. Dobór treści jest właściwy, ich przedstawienie jasne, a tekst napisany ciekawie. Wstęp świadczy o bogatej wiedzy Pana Kołakowskiego w tematyce prowadzonych badań. Moje drobne uwagi są natury edytorskiej. W kilku miejscach w tekście są odniesienia do nieistniejących podrozdziałów 1.3 czy 1.4 (np. strony 14, 16, 25, 26, także w Wynikach strona 67) czy też zamieszczono niewłaściwe odwołania do rozdziału 1.2 (strony 19, 25, 28). Treści, do których są odniesienia przedstawiono w innych podrozdziałach wstępu, więc jest omyłka edytorska, nieco utrudniająca czytanie. Ponadto, błędnie podano nazwy białek HDAC6 (jako HADC6, strona 26) oraz EEA1 (jako EEA, strona 28). Wreszcie, procesy rozrodcze czy rozwoju nie są procesami wewnątrzkomórkowymi, jak napisano na stronie 30: (Jony wapnia) „Regulują niemal wszystkie procesy wewnątrzkomórkowe zaczynając od procesów rozrodczych, podziałów komórki, rozwoju, procesach skurczu mięśni czy uwalnianiu neuroprzekazników w komórkach nerwowych, kończąc na apoptozie (Berridge i wsp., 2003)”.

W kolejnym rozdziale, poprawnie uzasadniono i sformułowano **Cel pracy**, jako „charakterystykę wybranych domen, białka *Vps13* i choreiny, wiążących białka i lipidy oraz określenie ich roli w lokalizacji i funkcjonowaniu tych białek”. Cel główny osiągnięto poprzez realizację sześciu celów szczegółowych.

Rozdział **Materiały i metody** zawiera 11 podrozdziałów, w których opisano użyte szczepy drożdży i konstrukty DNA, a następnie techniki biochemiczne analiz białek (Western blot, oczyszczanie białek, badania oddziaływań białek z lipidami i GTPazą *Arf1*), test sekrecji karboksypeptydazy *Y*, badania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i analizy bioinformatycznej *in silico*. Zastosowane metody zostały poprawnie dobrane do założonych celów. W większości opis metod jest dokładny i wystarczająco szczegółowy do powtórzenia doświadczeń, choć w przypadku przeciwciał należałoby podać nie tylko producenta i rozcieńczenie, ale również konkretny numer katalogowy (niektórzy producenci oferują kilka przeciwciał przeciwko jednemu białku). Z kolei w opisie metod mikroskopii nie podano jakiego obiektywu ani filtrów używano, zabrakło także przedstawienia jak analizowano obrazy pod względem ilościowym (np. czy dane struktury były zliczane ręcznie czy automatycznie, jakie były kryteria ich rozpoznawania, itp.).

Rozdział **Wyniki** zawiera 25 rycin prezentujących rezultaty badań Doktoranta wraz z opisem przeprowadzonych doświadczeń, uzasadnieniem ich wykonania i wnioskami wyciągniętymi na podstawie uzyskanych wyników. Pierwsza część badań była poświęcona charakterystyce domen APT1 drożdżowego białka *Vps13* oraz ludzkiej choreiny. Pan Kołakowski udowodnił, że domeny

APT1 są niezbędne do prawidłowego działania tych białek, choć wzajemnie nie są funkcjonalnie wymienne. W przypadku białka Vps13, domena APT1 decyduje o jego lokalizacji w miejscach kontaktu błon siateczki śródplazmatycznej związanej z jądrem i wakuoli (NVJ, ang. nucleus-vacuole junction). W przypadku choreiny, Doktorant odkrył, że jej domena APT1 wiąże dwa rodzaje fosforanów fosfatydyloinozytolu: PI3P i PI5P, przy czym wiązanie do PI3P jest regulowane przez dwuwartościowe jony metali, takie jak wapń i magnez. Z kolei patogenna mutacja I2771R w domenie APT1, występująca u pacjentów z płasawico-akantocytozą, zmienia lokalizację wewnątrzkomórkową choreiny. W drugiej części badań, Pan Kołakowski charakteryzował, za pomocą metod genetycznych i biochemicznych, oddziaływanie białka Vps13 i GTPazy Arf1. Doktorant wykazał, że oddziaływanie to zachodzi poprzez domenę PH-like białka Vps13, która wiąże PI(4,5)P₂. W części trzeciej, podczas badań funkcjonalności motywu FFAT białka Vps13, Pan Kołakowski odkrył rolę tego białka w regulacji wielkości i liczby ciałek lipidowych w komórkach drożdży.

Wysoko oceniam poziom naukowy uzyskanych wyników, które są efektem dobrze zaplanowanych i poprawnie wykonanych eksperymentów. Doktorant logicznie argumentuje dlaczego wykonał określone doświadczenia i wysnuwa właściwe wnioski na podstawie uzyskanych rezultatów, bez ich nadinterpretacji. Świadczy nie tylko o sprawności technicznej, ale również dojrzałości naukowej Pana Kołakowskiego.

Mam następujące uwagi i pytania do tej części rozprawy:

- Jak już wspomniałam powyżej, w doświadczeniach wykorzystujących ilościową analizę obrazów mikroskopowych, zabrakło mi szczegółów jej przeprowadzenia. Dotyczy to Ryc. 6D, 7A, 21D, 28, 29 i 30.

- Ryc. 10 i dalsze, które przedstawiają wyniki wiązania do liposomów, gdzie obliczano stosunek białek związanych z poszczególnymi liposomami do białka nałożonego (input). Jaka ilość białka nałożonego zawierają przedstawione bloty oznaczone „Input” (które w zasadzie powinny być częścią jednego blotu z próbkami badanymi, dla spójności analiz ilościowych)?

- Rozdział 4.1.5 i Ryc. 12: stwierdzenie, że „wiązanie GST-hAPT1^S do PI3P wykazywało niskie powinowactwo we wszystkich badanych warunkach”. Na jakiej podstawie uznano to powinowactwo za niskie? Wiązanie to jest porównywalne do wiązania GST-hAPT1 i GST-hAPT1* w obecności EDTA (Ryc. 10).

- Rozdział 4.1.7 i Ryc. 14: Doktorant stwierdza, że: „podwyższony poziom wapnia prowadzi do obecności domeny GFP-hAPT1* w wielu małych strukturach rozproszonych po całej komórce (Ryc. 14A)”. Na przedstawionych obrazach mikroskopowych barwienie domeny GFP-hAPT1* jest praktycznie niewidoczne i przez to niemożliwe do interpretacji.

- Ryc. 18: jako kontroli, zabrakło mi dla porównania barwienia VPS13-GFP bez nadekspresji genu *MCPI*, w obu badanych szczepach.

- Rozdział 4.2.2 i Ryc. 21: wydaje się, że przy zastosowanej rozdzielczości obrazowania nie jest możliwa wizualizacja pojedynczych pęcherzyków opłaszczonych klatryną (o średnicy zwykle nie przekraczającej 100 nm). Badano prawdopodobnie większe skupiska klatryny, np. łatki klatryny (ang. clathrin patches).

- Rozdział 4.2.4 i Ryc. 24, badanie oddziaływań domen PH-like i Arf1. Przedstawiono wyniki doświadczeń z użyciem jedynie Arf1-GTP, podczas gdy standardem w badaniach GTPaz jest porównywanie oddziaływań danego białka z GTPazą zarówno związaną z GTP, jak i GDP – i

tej ostatniej kontroli mi zabrakło. Mam również zastrzeżenie techniczne: dlaczego blot kontroli samego GST jest osobny i ma ewidentnie inny czas ekspozycji membrany przy wywoływaniu? Wreszcie, skąd wiadomo, że Arf1 tworzy dimery i oligomery odporne na działanie SDS i widoczne na żelu SDS-PAGE?

- Rozdział 4.3.1: pojęcie „stresu SDS” nie zostało jasno wytłumaczone. Choć to określenie pojawia się już w streszczeniu, nie zostało omówione we Wstępie w kontekście białka Vps13. Nie zostało też wprowadzone w Wynikach, gdzie pojawia się już wyłącznie we wniosku, iż motyw FFAT białka Vps13 nie jest potrzebny w odpowiedzi na stres SDS. Ponadto, wcześniej, na str. 63 pojawiają się określenia „stres proteotoksyczny” oraz „stres proteolityczny”. Czy są to w tym wypadku synonimy?

Dyskusja rozprawy jest obszernym, rzetelnym i ciekawym omówieniem wyników i ich znaczenia w szerokim kontekście dostępnej literatury przedmiotu, dotyczącej zarówno modeli drożdży, jak i komórek ludzkich. Nie mam zastrzeżeń do tej części rozprawy, która świadczy o wiedzy i dojrzałości naukowej Doktoranta. Dyskusja jest ilustrowana trzema schematycznymi rycinami, które ułatwiają zrozumienie dyskutowanych modeli molekularnych wiązania białek Vps13 do błon czy ich możliwego udziału w niepęcherzykowym transporcie lipidów między błonami. Na zakończenie rozprawy, Pan Kołakowski identyfikuje cztery zasadnicze pytanie do rozstrzygnięcia w dalszych badaniach białek Vps13 oraz poprawnie formułuje ostateczne wnioski ze swoich badań.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana bardzo starannie, praktycznie bez błędów literowych, z nielicznymi błędami interpunkcyjnymi, w większości poprawnym językiem naukowym. Wymienię parę niedociągnięć i niespójności, aby ich unikać podczas pisania kolejnych tekstów:

- Rażą kilkakrotnie powtarzane żargonowe określenia „białka wyrażano” albo „eksprymowano”. To geny (a nie białka) ulegają ekspresji, a białka można produkować w bakteriach (i takie poprawne sformułowanie także pojawia się w rozprawie). Podobnie można wyciszyć ekspresję genu, nie sam gen.

- Niespójne używanie różnych skrótów na określenie tych samych wyrażen: godz/h, PI3P/PI(3)P/PtdIns(3)P, PI4P/PI(4)P/PtdIns(4)P, i dalsze fosforany fosfatydyloinozytolu (np. w legendzie do Ryc. 8 w porównaniu do wykazu skrótów), określane jako difosforany/bisfosforany, trifosforany/trisfosforany, itd.

- Analizy wykonywane „przy udziale mikroskopii fluorescencyjnej” powinny być określone jako wykonywane z użyciem czy z wykorzystaniem mikroskopii.

- Ilość ciałek lipidowych, cystern czy prac powinna być określona jako liczba ciałek, cystern czy prac, ze względu na ich policzalność.

Te niedostatki edytorskie nie wpływają jednak na odbiór i zrozumiałość całej rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Damiana Kołakowskiego podejmuje istotne pytania naukowe z dziedziny molekularnej biologii komórki. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, a ich wyniki poszerzają naszą wiedzę o strukturze i funkcji białek Vps13. O ich znaczeniu świadczy fakt, że znaczna część rezultatów zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w roku 2020 w pracy, która ukazała się w *BBA Biomembranes* i której Pan Kołakowski jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorant jest

współautorem dwóch publikacji doświadczalnych oraz współautorem pracy przeglądowej w *Postęпах Biochemii*, napisanej wraz z Panią Promotor.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr. Damiana Kołakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marta Miszyńska