



RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Damiana Kołakowskiego pod tytułem:
„Charakterystyka i funkcja wybranych domen i motywu FFAT drożdżowego białka Vps13 i ludzkiej choreimy”

Tematyka badań i cele rozprawy

Rozprawa doktorska autorstwa Pana mgr Damiana Kołakowskiego to opracowanie posiadające dwa powiązane oblicza naukowe; z jednej strony Autor skupia się na określeniu funkcji drożdżowego białka Vps13 czy jego ludzkiego homologa choreiny; a z drugiej strony stara się przybliżyć rolę tego białka w patogenezie rzadkiej choroby nerodegeneracyjnej zwanej płasawicą-akantocytą (ang. *chorea-acanthocytosis* – ChAc). Praca ta to przykład mariażu nauk podstawowych z aspektami aplikacyjnymi, co w dalszej przyszłości może otworzyć drogę do opracowania terapii dla schorzenia ChAc. Tematem przewodnim jest białko choreina należąca do dużej rodziny białek Vps13. Funkcja tego białka nie została dokładnie zdefiniowana, a białko to znajduje się jako element błon komórkowych, wchodząc w skład charakterystycznych struktur, zwanych MCS – *Membrane Contact Site*. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż białka Vps13 to długie polipeptydy, które posiadają ponad 3100 reszt aminokwasowych, a zatem należy podkreślić iż rozmiary białka stanowią duże wyzwanie analityczne. W związku z tym Autor skupił swoje zainteresowania na kilku fragmentach białka Vps13, tj. domeny: APT1, PH oraz motyw FFAT wykorzystując drożdżowy model eksperymentalny. Pan mgr Damian Kołakowski z powodzeniem zastosował szeroki wachlarz technik analitycznych z zakresu biochemii, biologii molekularnej i biologii komórki, co czyni Go osobą o wysokich kompetencjach eksperymentalnych. Należy podkreślić, iż prowadzone badania dotyczące funkcji białek Vps13 są przedmiotem wieloletnich badań macierzystego laboratorium Doktoranta, toteż Jego praca kontynuująca te badania osadzona jest tematycznie i metodycznie w solidnych zasobach wiedzy specjalistycznej.

Ocena pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska to opracowanie naukowe przygotowane w klasycznym układzie, zawierającym, streszczenie, wprowadzenie wraz z celami pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja oraz w końcowej części praca została zaopatrzona w dział perspektywy i podsumowanie; pracę kończy zestaw literatury. Dodatkowo, opracowanie poprzedza dorobek naukowy Doktoranta, wskazując że jest on pierwszym autorem publikacji w uznanym czasopiśmie naukowym - BBA-Biomembranes oraz dodatkowo jest On współautorem trzech publikacji naukowych. Ponadto, Autor uczestniczył w szeregu międzynarodowych zjazdach naukowych, co wskazuje, na Jego wysoką aktywność w społeczności naukowej.

Pierwsza część opracowania to autorskie opracowanie stanu wiedzy na temat białek Vps13. Początkowo, Doktorant skupił swoją uwagę na aspekcie bio-medycznym w powiązaniu z rodziną białek Vps13, wskazując że szereg mutacji w tych białkach wywołuje tzw. choroby rzadkie jak już



wspomniana ChAc czy zespół Cohena, ale także białka te powiązano z takimi stanami patologicznymi jak choroba Parkinsona, cukrzyca czy nawet nowotworzenie. Szczególna uwaga została poświęcona strukturze białek Vps13, czego wyrazem jest przygotowana rycina 1, będąca doskonałym podsumowaniem analizy strukturalnej rodziny białek Vps13. Autor, opisał wszystkie elementy strukturalne wchodzące w zakres białek Vps13, w szczególności zwrócił uwagę na drożdżowe białko oraz jego ludzki homolog zwany choreiną. Z racji na ogromne rozmiary białka Vps13, ilość elementów strukturalnych jest imponująca; Autor w sposób wyczerpujący nie tylko dokonał analizy strukturalnej ale także baczną uwagę zwrócił na aspekt funkcjonalny, co tworzy ciekawe kompendium wiedzy strukturalno-funkcjonalnej na temat choreiny i jego homologów. Dużo uwagi zostało poświęcone domenie APT1, która jest jednym z zasadniczych obiektów badawczych Doktoranta, wskazując na jej kluczową rolę w wiązaniu fosforanu fosfatydyloinozytolu (PI3P), a w szczególności wskazał na ciekawą mutację w tej domenie I277R, która została powiązana z chorobą ChAc. Ponadto, Jego zainteresowanie także zostało skierowane na domenę PH, która wraz z domeną ATG_C gra kluczową rolę w interakcji białka Vps13 z mitochondriami. Dalsza część opracowania to zwrócenie uwagi na aspekt funkcjonalny białek Vps13. Autor podkreślił że białka Vps13 to przede wszystkim białka błonowe, które występują w połączeniu z licznymi organellami komórki, jak: mitochondria, aparat Golgiego, endosomy, ciała lipidowe i peroksysomy. Ale co istotne, szereg tych białek występuje w miejscach kontaktu organelli, w strukturach zwanych MCS – *Membrane Contact Site*, co czyni je kluczowymi elementami w kontroli utrzymania właściwej architektury organelli w komórce. Ponadto, Autor zwrócił uwagę na mało poznany aspekt działania białek Vps13, tj. udział w utrzymaniu homeostazy lipidowej w komórce, wskazując że białka te występują w kompleksie z tzw. ciałkami lipidowymi, a tym samym mogą wpływać na metabolizm lipidów, jak na przykład transport pochodnych fosfatydyloinozytolu. Ciekawym aspektem wstępu w doktoracie jest podjęty aspekt techniczny prac badawczych. W nawiązaniu do białek Vps13 oraz ich powiązania z metabolizmem lipidów, Autor scharakteryzował metody badania oddziaływań lipidów z białkami, a przede wszystkim nakreślił rolę pochodnych fosfatydyloinozytolu w modulowaniu interakcji błon z licznymi białkami efektorowymi, które stanowią kluczowy element wielu szlaków związanych z transmisją sygnału w komórce. Podejście ciekawe, rzadko spotykane, wskazujące na fakt iż Autor posiada głęboką świadomość, że sukces w badaniach to doskonale opanowany warsztat badawczy, co pozwala na dostarczenie odpowiedzi na kluczowe pytania naukowe.

Podsumowując, wstęp przygotowany przez Pana mgr Damiana Kołakowskiego to autorskie opracowanie stanu wiedzy na temat białek Vps13, które charakteryzuje się spójną narracją naukową, kładąc nacisk na aspekty bio-medyczne w kontekście funkcji choreiny, nie zapominając o aspektach warsztatu naukowego, który stanowi klucz do sukcesu. Opracowanie to wskazuje na gruntowną wiedzę merytoryczną Autora, oraz pokazuje krytyczne podejście do problemu, co zapewne umożliwia kreatywną pracę naukową.

Druga część pracy doktorskiej to prezentacja części doświadczalnej, która składa się z trzech elementów: charakterystyka domeny APT1; charakterystyka domeny PH w obrębie białek Vps13, oraz analiza funkcjonalna motywu FFAT.



Pierwsza część pracy do analiza funkcjonalna domeny APT1; Doktorant czerpiąc z zasobów wiedzy specjalistycznej zespołu badawczego kierowanego przez dr hab. Joannę Kamińską zmapował pozycję domeny APT1 w białku Vps13, biorąc za cel układ drożdżowy jak i ludzi homolog – choreinę. Jako model eksperymentalny wykorzystał drożdże *S. cerevisiae*, doskonały model do wszelkich działań analitycznych z racji na ogrom narzędzi genetyczno/biochemicznych jakie są dostępne dla tego organizmu modelowego. Pierwsze pytanie, jakie zostało zadane to czy drożdżowa domena APT1 może być komplementowana przez jej ludzki odpowiednik. Podejście to, należy do jednych z podstawowych podejść badawczych, ponieważ umożliwia to opracowanie modelowego układu eksperymentalnego, w którym wykorzystywane są drożdże do analizy szlaków metabolicznych z wyższych eukariontów. W tym celu Doktorant przygotował liczne hybrydowe układy genetyczne, np. zamiany drożdżowej domeny APT1 na jej ludzki odpowiednik. Wykorzystując mutant drożdżowy *vps13Δ* komplementowany otrzymanymi układami genetycznymi, niestety okazało się, że ludzka domena hAPT1 nie komplementuje funkcjonalnie domeny drożdżowej. Jednakże, z analizy tej wynika, że brak tej domeny w drożdżowym białku Vps13 nie przywraca tzw. dzikiego fenotypu mutantu, co pozwoliło stwierdzić Doktorantowi, że domena ta jest kluczowym elementem w funkcjonowaniu białka Vps13. Rozszerzeniem analiz funkcjonalnych domeny APT1 była analiza subkomórkowej lokalizacji białka Vps13-GFP oraz jego formy delecyjnej. Doktorant wykorzystując szereg markerów np. dla edosomów, struktur NJV, ciałek lipidowych czy mitochondriów prześledził zachowanie się białek Vps13, wskazując że domena yAPT1 jest istotnym elementem w kierowaniu Vps13 do takich struktur jak NJV, zaś pozostała lokalizacja Vps13 jest APT1 niezależna. W dalszych krokach, Doktorant zwrócił się w kierunku analiz *in vitro* w celu charakterystyki oddziaływania domeny APT1 z fosfolipidami. Wykorzystał oczyszczone rekombinowane białka w fuzji z GST, yAPT1 czy hAPT1 do analiz biochemicznych; Doktorant do analizy integralności białek wykorzystał *western blotting* – WB; w tym miejscu mam pytanie, co Doktorant rozumie przez słowo ‘integralność białka’, sformułowanie jest użyte w kontekście weryfikacji białka rekombinowanego; uważam, że WB nie jest idealną metodą to analizy integralności białka, jeśli integralność białka rozumiemy w formie zachowania jego struktury i funkcji. Wykorzystując metodę PIPstrips wskazał, że yAPT1 czy hAPT1 wiążą 3-fosforan fosfatydyloinozytolu, zaś hAPT1 wykazywał dodatkowo wiązanie także innych pochodnych fosfolipidów w przeciwieństwie do yAPT1 – uwypuklając różnice między tymi dwoma domenami z różnych organizmów. W opisie tych doświadczeń Doktorant ‘nieco’ nadużywa słowa powinowactwo, ponieważ nie mierzył On dynamiki oddziaływań i nie wyznaczał wartości Kd, co niestety nie uprawnia Go do użycia słowa powinowactwo. Pomimo tych drobnych nieścisłości semantycznych, Autor doskonale zdaje sobie sprawę z ograniczeń metody PIPstrips, a zatem zastosował komplementarną metodę z wykorzystaniem liposomów, dodając dodatkowy element analityczny w formie wpływów jonów Mg^{2+} czy Ca^{2+} . Analiza ta przyniosła ciekawe obserwacje, wskazując że yAPT1 wiąże efektywnie 3-fosforan fosfatydyloinozytolu niezależnie od obecności jonów, w przeciwieństwie do hAPT1, która wykazuje zależność pozytywną od obecności Mg^{2+} czy Ca^{2+} w stosunku to tego fosfolipidu jak i do innej formy, 5-fosforan fosfatydyloinozytolu. Bardzo ciekawą analizą, wykonaną przez Doktoranta, to badanie wpływu mutacji I₂₄₇R w domenie hAPT1, która została opisana jako mutacja występująca w schorzeniu ChAc; analiza z wykorzystaniem liposomów wskazała, że zmutowana domena mniej efektywnie wiąże fosfolipidy, co wnosi nowe



spojrzenie na etiologię choroby ChAc. Wykonane badania zostały suplementowane dodatkowymi analizami z wykorzystaniem homologicznej domeny yAPT1a z drożdżowego białka Atg2, wskazując, że domena ta podobnie jak jej homologi z białek Vps13 efektywnie wiąże 3-fosforan fosfatydyloinozytolu jednakże w tym przypadku tylko w obecności jonów Ca^{2+} . W ramach kontynuacji wątku eksperymentalnego w tematyce domena hAPT1, Autor określił że C-terminalny fragment 11-aa jest odpowiedzialny za wiązanie jonów Mg^{2+} czy Ca^{2+} w tej domenie co można interpretować jako utrata kooperatywności w wiązaniu 3-fosforanu fosfatydyloinozytolu. Analizy wykonane przez Doktoranta nie budzą zastrzeżeń, ale jeden aspekt można uznać jako podejście dyskusyjne, a mianowicie (jak już pisałem powyżej) analiza WB nie może być użyta, jak pisze Autor, do oceny 'jednorodności i integralności' otrzymanego białka rekombinowanego; myślę że szereg analiz biofizycznych powinno być zastosowanych do walidacji jakości oczyszczonego białka rekombinowanego, z SDS-PAGE na czele aby pokazać czystość użytego białka oraz np. CD do wskazania integralności strukturalnej. W tym miejscu nasuwa się dodatkowe pytanie, co Autor sądzi o wykorzystaniu takich technik jak MST, BLI, SPR czy ITC do analizy powinowactwa i kinetyki oddziaływań między białkiem a lipidami, czy te techniki mogą być użyteczne w kontekście przeprowadzonych analiz. W dalszych krokach, prace biochemiczne *in vitro*, zostały uzupełnione o analizy *in vivo*. Wykorzystując model drożdżowy Doktorant wskazał że domeny yAPT1 i hAPT1 zachowują się w komórce drożdżowej podobnie - w obecności jonów Ca^{2+} - co może wskazywać o funkcjonalnym ich podobieństwie; a w związku z tym interesujące byłoby przeprowadzenie komplementacji mutantu drożdżowego *vps13Δ* w obecności Ca^{2+} ; jednakże obserwowane zachowanie się tych białek może być obarczone błędem, ponieważ, jak zauważył Autor, wydaje się że mogą się one akumulować w komórce jako agregaty związane nadprodukcją białka; w związku z tym czy rozpatrywano zmianę systemu ekspresji, czy to z wykorzystaniem tzw. wektorów niskokopijnych, czy może regulacja ekspresji np. z wykorzystaniem regulatorowego systemu, np. Tet_{on/off}.

Kolejna część pracy doktorskiej to analiza wzajemnych zależności funkcjonalno-strukturalnych białka Vps13 w stosunku do szeregu partnerów białkowych, wraz z rolą domeny PH. Jako pierwszy krok, to analiza zależności funkcjonalnej Vps13 i białka Arf1, które stanowi istotny element w rekrutacji wielu białek do struktur takich jak np. mitochondria czy inne elementy zawierające błony komórkowe. Wykorzystując przygotowany zestaw termo-wrażliwych mutantów drożdżowych (*arf1-3 arf2Δ* i *arf1-3 arf2Δ vps13Δ*) Autor wskazał, że istnieje tzw. genetyczne powiązanie funkcjonalne między Vps13 i Arf1, pokazując brak wzrostu potrójnego mutantu *arf1-3 arf2Δ vps13Δ* na podłożu z glicerolem w podwyższonej temperaturze; autor pisze, „Oznacza to że geny *ARF1* i *VPS13* wykazują oddziaływanie genetyczne ...” – w rzeczy samej, zgadam się z tym stwierdzeniem, jednakże w następnym zdaniu Doktorant stwierdza „Może to wskazywać na to że białko Vps13 działa niezależnie od białka Arf1 w procesach wpływających na funkcjonowanie mitochondriów” – mam wrażenie, że pojawia się w tym miejscu niespójność koncepcyjna, co skłoniło Autora do takiego stwierdzenia. Podobną analizę Autor wykonał wykorzystując inny układ selekcyjny, kanawaninę; pojedyncze delecyjne mutanty drożdżowe czy to w genie *ARF1* czy *VPS13* wykazują wrażliwość na kanawaninę, a ponadto potrójny termowrażliwy mutant wykazuje znacznie podwyższoną wrażliwość na ten związek, co ponownie wskazuje na synergizm funkcjonalny, a tym



samym może sugerować powiązanie funkcjonalne; ale w opisie tego doświadczenia Autor stwierdza „Defekt wzrostu mutantu potrójnego *arf1-3 arf2Δ vps13Δ* jest addytywny, rośnie on znacznie gorzej od pozostałych mutantów przy stężeniu kanawaniny 1,25 µg/ml, Ryc. 22” ale w następnym zdaniu pisze: „Sugeruje to że białko Vps13 i GTPaza Arf1 działają niezależnie w procesie endocytozy” – dlaczego Doktorant stawia taką tezę? Moim zdaniem potwierdzeniem powiązania funkcjonalnego, jest kolejna analiza wykonana przez Doktoranta, w której wykorzystał On technikę chromatografii powinowactwa, wskazuje, że istnieje potencjał do interakcji domeny PH yVps13/hVps13 z białkiem Arf1. Na potwierdzenie tego faktu, Doktorant wykonał analizę subkomórkowej lokalizacji białka hybrydowego yPH-GFP w mutantach delecyjnych, *vps13Δ* oraz *arf1-3 arf2Δ vps13Δ*, co wskazało na kooperatywność w działaniu domeny PH i białka Arf1 w kompartmentach trans-Golgi. Dodatkowo, Autor przeanalizował oddziaływania funkcjonalne Vps13 z jego potencjalnym białkiem efektorowym Mcp1, pokazując ko-lokalizację tych białek w komórkach drożdżowych w mitochondriach; ponadto analizy genetyczne wskazały, że nadekspresja białka Mcp1 nawet w mutancie *arf1-3 arf2Δ* częściowo przywraca fenotyp dziki, tj. wzrost na podłożu z glicerolem; dodatkowo analiza morfologii mitochondriów wskazała kooperatywność w działaniu białka Mcp1 z Vps13; myślę że można się pokusić o wniosek, że takowa kooperatywność występuje także między Mcp1 i Arf1, na bazie zaprezentowanych analiz. Dlatego też, nie do końca zgadzam się ze stwierdzeniem Doktoranta, cytując „Powyższe wyniki wskazują, że oba białka Vps13 i Arf1 wpływają na funkcjonowanie mitochondriów, lecz działają one niezależnie od siebie” – myślę, że można założyć, że takowa zależność występuje, oczywiście bez stwierdzenia jasnej konfiguracji tych zależności. W myśl tych eksperymentów, Autor przeprowadził analizę sekrecji hydrolazy wakuolarnej, która ulega efektywnej sekrecji w mutancie *vps13Δ*; zatem ponownie wykorzystując termo-wrażliwe mutanty *arf1-3 arf2Δ* czy *arf1-3 arf2Δ vps13Δ* wskazał, że w tym przypadku nie zaobserwował wyraźnego synergizmu, tj. ilość wydzielanej do podłoża hydrolazy wakuolarnej nie zmieniła się w sposób istotny. A zatem, na bazie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że zależności funkcjonalne między białkiem Vps13 a Arf1 występują, ale tylko w określonych szlakach metabolicznych.

Ostatni element pracy to analiza roli motywu FFAT białka Vps13. Motyw ten został zidentyfikowany przez Doktoranta w białku Vps13, w jego centralnej części. Informacje literaturowe donoszą, że białka posiadające motyw FFAT są zaangażowane w interakcje z białkami transbłonowymi, a motyw ten gra kluczową rolę w tej interakcji. Zatem, Doktorant przygotował konstrukt genetyczny z mutacjami punktowymi F₁₅₂₂A i A₁₅₂₄R, a następnie wykonał analizę funkcjonalną wykorzystując mutant delecyjny *vps13Δ*; do analizy wykorzystał dwa układy analityczne, cechy fenotypowe (wrażliwość na SDS czy kanawaninę) oraz zaangażowanie Vps13 w regulację wielkości ciałek lipidowych. Niestety, analizy komplementacji mutantu delecyjnego wskazały, że motyw FFAT w białku Vps13 nie ogrywa istotnej roli w stresie związanym z obecnością detergentu SDS oraz obecność zmutowanego białka nie wpływa na wzrost komórek drożdżowych w obecności kanawaniny; ponadto z analiz tych wynika, że obecności tego motywu nie można powiązać z regulacją biogenezy ciałek lipidowych. Przeprowadzone analizy, to dobry przykład działań w zakresie prac, które można nazwać ‘high risk – high gain’, w których eksploracja naukowa nie zawsze kończy się pozytywnym wynikiem, ale cytując słowa Plutarcha: ‘Początkiem zwycięstwa



jest odwaga', i właśnie z takich działań składa się biologia eksperymentalna, a Doktorant nie wahał się podjąć ryzyka.

Podsumowując, Pan mgr Damian Kołakowski wykorzystując bardzo szerokie spektrum technik analitycznych, poczynszyszy od analiz w zakresie genetyki drożdży, poprzez techniki biologii molekularnej, biochemii i biologii komórki scharakteryzował funkcjonalnie rolę domen APT1 i PH rodziny białek Vps13, w bardzo szerokim zakresie czego rezultatem jest znaczące rozszerzenie naszej wiedzy na temat funkcjonowania tego białka, ale co równie ważne, nie tylko w kontekście podstawowych aspektów poznawczych, ale także rzucił światło na patogenezę choroby ChAc. Tak szeroki zakres przeprowadzonych prac badawczych oraz narracja naukowa w dyskusji, wraz z zamieszczeniem zintegrowanych modeli funkcjonowania białka Vps13 w komórce eukariotycznej, wskazuje że mgr Damian Kołakowski posiada wysokie umiejętności w zakresie planowania, przeprowadzania prac badawczych, analizy danych eksperymentalnych oraz interpretacji wyników.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska to opracowanie naukowe, przedstawiające autorskie dokonania naukowe Pana mgr Damiana Kołakowskiego, które spełnia standardy stawiane opracowaniom tego typu. Stwierdzam, że sposób prezentacji danych eksperymentalnych wraz z analizą wyników i przeprowadzona dyskusja naukowa zrealizowane zostały przez Doktoranta w sposób nie budzący zastrzeżeń. Praca doktorska reprezentuje wysoki poziom metodyczny i merytoryczny, z dojrzałą analizą danych eksperymentalnych. Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016r. poz.882) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, o dopuszczenie Pana mgr Damiana Kołakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin 31.08.2020

Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

