

Dr hab. Anna Bielak-Żmijewska, profesor instytutu
Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
a.bielak@nencki.edu.pl

Warszawa, 21.02.2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Błażeja Michała Kempnińskiego

pt. Identyfikacja nowych sekwencji aminokwasowych kierujących białka do peroksysomów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN pod kierunkiem dr hab. Marka Skonecznego.

Peroksysomy, organelle powszechnie obecne w komórkach organizmów eukariotycznych, pełnią bardzo wiele funkcji metabolicznych. Biorą udział w neutralizacji nadtlenu wodoru, detoksykacji komórki wystawionej na działanie metanolu i etanolu, oksydacji kwasów tłuszczowych, rozkładzie ksenobiotyków, syntezie aminokwasów oraz cholesterolu. Jedną z najbardziej uniwersalnych funkcji peroksysomów jest β -oksydacja kwasów tłuszczowych, co w przypadku komórek zwierząt jest szlakiem alternatywnym do szlaku mitochondrialnego, a w komórkach grzybów i roślin odbywa się tylko w proksysomach. Największe nagromadzenie peroksysomów ma miejsce w komórkach wątroby i nerek. Aby organelle te mogły prawidłowo pełnić swoje funkcje, do ich wnętrza muszą przedostać się białka zaangażowane w procesy metaboliczne. W β -oksydacji kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* biorą udział m.in. oksydaza acylo-CoA (AOx), katalaza A (Cta1p) oraz wielofunkcyjny enzym Fox2p. Mimo dość intensywnych badań, cały czas istnieją luki w wiedzy dotyczącej mechanizmów odpowiedzialnych za import białek do peroksysomów. Import odbywa się zarówno dzięki białkom na stałe związanym z błoną peroksysomów, jak i krążącym między cytoplazmą a ich wnętrzem. Białka docelowo działające w peroksysomach posiadają tzw. sygnały kierujące do peroksysomów, PTS (peroxisomal targeting signal). Dotychczas dobrze poznano i opisano dwa takie sygnały, PTS1 i PTS2 i w przypadku każdego z nich inne białka, peroksyny, są odpowiedzialne za rozpoznanie sygnału. Pewne dane wskazują, że istnieje jeszcze trzeci sygnał kierujący białka do peroksysomów, PTS3, zakodowany nie na końcu, ale wewnątrz polipeptydu. Dotychczas były to jednak przypuszczenia i brak było bezpośrednich dowodów na jego obecność. Wyjaśnienia tego zagadnienia podjął się Doktorant. Dodatkowo postanowił znaleźć jeszcze inne, niż poznane

dotychczas, białka peroksysomalne, które przedostają się do peroksysomów wykorzystując hipotetyczny sygnał PTS3.

Poznanie funkcjonowania peroksysomów oraz mechanizmu odpowiedzialnego za transport białek do ich wnętrza jest istotnym problemem badawczym, gdyż organelle te są wszechobecne w komórkach zwierzęcych i roślinnych, co czyni badania uniwersalnymi z punktu widzenia biologii komórki. Mają one również aspekt praktyczny, gdyż zidentyfikowano wiele chorób człowieka, u podstaw których leży brak lub nieprawidłowe funkcjonowanie peroksysomów. Do najpoważniejszych należy spektrum zespołu Zellwegera, choroba spowodowana całkowitym brakiem wytwarzania peroksysomów w tkankach. Charakteryzuje się ona gromadzeniem kwasów tłuszczowych w płynach ustrojowych, w wyniku czego dochodzi do upośledzenia funkcji wielu narządów takich jak wątroba, nerki, szkielet, jak również do poważnych zaburzeń neurologicznych.

Celami pracy było udowodnienie obecności i scharakteryzowanie budowy sygnału importu do peroksysomów PTS3 w oksydazie acylo-CoA oraz zidentyfikowanie jeszcze innych białek, których transport odbywa się poprzez hipotetyczny sygnał PST3. Cele są jasno określone, oparte na przekonujących przesłankach wynikających z wcześniejszych badań prowadzonych przez dr hab. Skonecznego, jak i na danych literaturowych.

Odnosząc się do strony formalnej, rozprawa ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań, liczy 108 stron i zawiera: spis treści, streszczenie po polsku i angielsku, wykaz stosowanych skrótów, wstęp teoretyczny, cele pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz bogatą bibliografię (zawierającą 235 pozycji). W tekście zamieszczono 29 rycin i 9 tabel, 1/3 rycin ilustruje treści opisane we Wstępie. W pracy znajduje się podsumowanie, ale brak jest wypunktowanych wniosków. Dysertacja napisana jest w sposób jasny, ładnym polskim językiem naukowym i jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Zawiera jedynie nieliczne i bardzo drobne błędy czy niezręczne sformułowania (zamieszczone poniżej w Uwagach). Ryciny są bardzo estetyczne, przemyślane i czytelne. Pewien niedosyt budzi wykaz skrótów, który nie zawiera wszystkich wykorzystanych w rozprawie, a z drugiej strony uwzględnia skróty dość oczywiste lub takie, które mogłyby znaleźć się tylko w sekcji opisującej materiały i metody. Zastrzeżenia dotyczą również zbyt skrótowego opisu metodyki.

Wstęp jest napisany bardzo jasno, zwięźle i zawiera wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia zagadnienia oraz przesłanki stanowiące punkt wyjścia do podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Autor dokonuje przeglądu aktualnej wiedzy, a sposób, w jaki to robi świadczy o dobrej orientacji Doktoranta w zagadnieniach będących

przedmiotem badań. Doktorant szczegółowo opisuje budowę i funkcję peroksysomów oraz dostępną wiedzę o imporcie białek do tych struktur komórkowych. Szczególny nacisk położony jest na import białek do peroksysomów drogą zależną od PTS1 i PTS2, jak również zwrócona jest uwaga na istnienie importu niezależnego od obecności tych sygnałów. Dobrze uzasadniono znaczenie tego procesu dla funkcjonowania peroksysomów. Ostatni rozdział Wstępu poświęcony jest chorobom wynikającym z wadliwie funkcjonujących peroksysomów, co w pełni uzasadnia ważność i uniwersalność prowadzonych badań. Wstęp wzbogacony jest 9 rycinami i dwoma tabelkami, co jest bardzo pomocne w śledzeniu opisanego zagadnienia. Ryciny przygotowane są bardzo starannie i ich dobór jest uzasadniony. Rozdział ten stanowi rzeczywiście bardzo dobry wstęp do przedstawienia celu pracy, zawiera istotne informacje bez obciążania szczegółami i czyta się go bardzo dobrze.

Materiały i Metody nie zawsze zawierają dostatecznie szczegółowy opis. Niedosyt budzi odwoływanie się jedynie do opisu podanego przez producenta. Wydaje się być stosownym opisanie, choćby z zarysie, jak dana metoda była wdrożona przez Doktoranta. Rozdział Materiały zawiera tabelki bardzo dokładnie opisujące wykorzystane podczas realizacji pracy szczepki drożdży i plazmidy. Osobną tabelkę przygotowano dla szczepów i plazmidów skonstruowanych na potrzeby pracy, jak i tych, pochodzących z innych źródeł. Mimo uwag do opisu należy podkreślić, że metodyka jest bogata, komplementarna i adekwatna do podjętych badań.

Rozdział Wyniki Doktorant zaczyna od przedstawienia przesłanek będących inspiracją do podjętych badań. Poświęcona jest temu rycina 10, obrazująca wyniki uzyskane wcześniej przez dr hab. Skonecznego oraz dwie strony tekstu. Można dyskutować, czy to jest odpowiednie miejsce na umieszczenie tego fragmentu, czy nie powinien się on znaleźć we Wstępie, przed Celem pracy. Według mojej opinii, tak byłoby lepiej. Wyniki zostały zobrazowane na 19 rycinach i w jednej Tabeli. Są one przedstawione w sposób logiczny i uporządkowany. Wykonanie poszczególnych etapów jest uzasadnione, a wyniki dobrze opisane i zilustrowane rycinami. W kilku miejscach pojawiają się jednak pewne bardzo drobne nieścisłości i błędy (zamieszczone w uwagach poniżej). W przypadku części wyników bardzo wskazana byłaby, obok analizy jakościowej, również analiza ilościowa, co wzmacniałoby istotność uzyskanych wyników. Dotyczy to dolnego zdjęcia znajdującego się na rycinie 16 oraz rycin od 21 do 25.

Efektom realizacji pracy doktorskiej było wykazanie, że hipotetyczny sygnał PTS3 nie jest zakodowany w ciągłej liniowej sekwencji, jak ma to miejsce w przypadku PTS1 i PTS2, tylko wynika ze struktury obszaru powierzchniowego natywnego białka. Poszukiwanie nowego

białka importowanego do peroksysomów przy wykorzystaniu potencjalnego sygnału PTS3 przyniosło efekt i Doktorant wykazał, że podobny mechanizm dotyczy białka Fox2p. Wiąże się ono z Pex5p, ale nie klasycznie w jego c-końcowym rejonie, a jego transport może odbywać się mimo niefunkcjonalnego sygnału PTS1. Import jest również niezależny od PTS2 oraz importu „na barana”. Pokazano ponadto, że nawet przy braku Pex5p transport może się odbywać, choć z mniejszym nasileniem, a za import odpowiedzialne jest Pex9p. Wyniki dotyczące Fox2p, oprócz zobrazowania importu na zdjęciach, zostały zanalizowane ilościowo, co bardzo wzmacnia istotność poczynionych obserwacji.

Podsumowując, część doświadczalną oceniam pozytywnie, uzyskane wyniki są dobrze przedstawione i przekonujące, a ich interpretacja nie budzi zastrzeżeń. W pracy brak jasno sformułowanych wniosków. Doktorant z dużą ostrożnością podchodzi do interpretacji otrzymanych wyników, unika kategoriycznych stwierdzeń i jest świadom konieczności dalszych badań, co świadczy o jego dojrzałości.

Dyskusja nie jest długa, ale trudno się nie zgodzić, że jest wystarczająca. Pierwszy jej rozdział po raz kolejny opisuje uzasadnienie do podjęcia badań i częściowo jest powtórzeniem. W rozdziale 6.1 Autor stawia hipotezy, które wydają się być punktem wyjścia do badań podjętych w pracy doktorskiej. Jednakże na końcu tego rozdziału wymienione hipotezy nazywane są wnioskami, co powoduje pewną konsternację. Autor spróbował skonfrontować otrzymane dane z wynikami dostępnymi w literaturze. Ale należy podkreślić, że brak jest danych dotyczących importu z udziałem PTS3 (oprócz pracy opublikowanej przez zespół, w którym pracował Doktorant) i Autor głównie dyskutuje otrzymane przez siebie wyniki, zresztą w interesujący i przemyślany sposób.

Poniżej przedstawiam zagadnienia, do których chciałabym, aby Doktorant się odniósł i które, mam nadzieję, przyczynią się do ciekawej dyskusji podczas obrony:

- Sygnał PTS1 jest sygnałem uniwersalnym. Sygnał PTS2 jest obecny w białkach roślinnych, brak go w białkach peroksysomalnych u *C. elegans* i *D. melanogaster*. Co wiadomo o białkach posiadających ten sygnał u ssaków? We Wstępie wspomniano tylko o tym, że u ssaków jest ko-receptor dla sygnału PTS2, a w Dyskusji, że jest on prawie u wszystkich grup systematycznych. Brak jednak jasnej informacji o udziale tego typu sygnału w komórkach ssaków. Czy PTS2 ma znaczenie w tych komórkach w imporcie białek? Jeżeli tak, to takie informacje powinny się znaleźć we wstępie. Jeżeli nie, to jaki jest potencjał translacyjny otrzymanych wyników na mechanizmy transportu białek do peroksysomów u człowieka? Jakie są przesłanki, że sygnał PTS3 może

odgrywać rolę w imporcie w komórkach człowieka? Czy i w jaki sposób poznanie PTS3 przybliży nas do zrozumienia i opracowania potencjalnych terapii w chorobach będących wynikiem nieprawidłowego działania peroksysomów? W Dyskusji jest to, co prawda, zasygnalizowane, ale bardzo, bardzo skrótowo i mało wyczerpująco.

- Autor napisał, że otrzymane wyniki są przesłanką do uznania pewnego rejonu w AOx za obszar tworzący sygnał PTS3. Ale czy jest to jednoznaczne z uzyskaniem dowodu, że taki sygnał rzeczywiście istnieje? Czy raczej konieczne jest poszukiwanie dalszych niezbitych dowodów? Jeżeli tak, to jakie badania Doktorant by zaproponował?
- Z drugiej strony, otrzymane wyniki wskazują, że rzeczywiście istnieje jakiś inny sposób na wchodzenie AOx do peroksysomów, ale czy można określić, że import odbywa się dzięki obecności kolejnego sygnału PTS i nazwać go PST3, skoro to nie jest liniowa sekwencja? Może lepsza byłaby jakaś inna nazwa dla takiego rodzaju importu?
- Wyniki dotyczące analizy importu Fox2p sposobem „na barana” nie są w pełni przekonujące. Na zdjęciach umieszczonych na rycinie 22, tylko w jednej z trzech komórek fox2Δ i Fox2p-GFP obserwowany jest import. Bardzo brakuje danych ilościowych.
- Z kolei w przypadku analizy heterodimerów Foxp2 z AOx lub Cat2p, na podstawie przedstawionych wyników można powiedzieć, że Fox2p nie potrzebuje do wejścia ani Cat2p, ani AOx. Nie można jednak wykluczyć, że Fox2p tworzy je z innym białkiem i dlatego wchodzi do peroksysomów.
- Często w komórkach obserwowane są różnice w liczbie peroksysomów. Czy niewielka ich liczba może świadczyć o zaburzeniach w ich powstawaniu, co mogłoby przekładać się na import białek, a tym samym być niespecyficznym efektem, niezależnym od intencji badacza?
- Jak transfekcja wpływała na liczbę i aktywność peroksysomów? Czy nie obserwowano negatywnych niespecyficzných efektów wynikających z samej procedury? Czy wiadomo, czy plazmidy nie powodowały dodatkowych zmian w genomowym DNA?
- Na jakiej podstawie wyodrębniono słabo widoczny prążek pokazany na rycinie 18? Ten zaznaczony czerwonym prostokątem nie wydaje się być jedynym możliwym.

Uwagi

- „Peroksysomy charakteryzują się indukowalnością”. Skrót myślowy. Rozumiem, że ich liczba może zmieniać się pod wpływem środowiska, stresu itp.

- „W tym celu geny te przeniesiono do plazmidów”- skrót myślowy.
- Odnośnik w tekście do Tabeli 1 znajduje się na str. 17, a sama tabela dużo dalej, na stronie 21. Tabela powinna być bliżej, bo to utrudnia czytanie. Podobnie rycina 9, odnośnik jest na str. 17, a rycina na 20.
- Rozbieżność między tekstem a ryciną. Na rycinie 11 jest 305 pz, a w tekście 308.
- NALD – adrenoleukodystrofia - niepełne wytłumaczenie skrótu w opisie do tabelki. Prawidłowe rozszerzenie skrótu pojawia się w tekście
- Rycina 17 - brak podpisu na osi Y
- Rycina 28 - środkowa kolumna nie ma odpowiadającego zdjęcia. Szkoda, bo reszta ma.

Podsumowując, podjęty temat jest interesujący i uniwersalny z punktu widzenia biologii komórki. Doktorantowi udało się zrealizować zamierzone cele. Rozprawa wskazuje na szeroką wiedzę Doktoranta, zarówno praktyczną jak i teoretyczną. Doświadczenia były pracochłonne, zaplanowane i przeprowadzone prawidłowo, a wyniki zinterpretowane właściwie. Wykorzystany warsztat metodyczny był nowoczesny, bogaty i optymalny dla realizacji celów pracy. Znaczna część wyników została opublikowana w *Journal of Cell Science*, gdzie Doktorant pełni rolę równorzędnego pierwszego autora. Uwagi krytyczne, bądź subiektywne niedosyt informacyjny nie wpływają na ogólną dobrą ocenę pracy.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr Błażeja Kempnińskiego spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Błażeja Kempnińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.

Warszawa, 21.07.2020



Anna Bielak-Żmijewska