

Rzeszów, dnia 21 lutego 2020 roku

dr hab. Renata Zadrąg-Tęcza, prof. UR  
Zakład Biochemii i Biologii Komórki

ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów  
Tel.: 17 785 54 13  
e-mail: reteczka@ur.edu.pl

## Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Błażeja Kempiańskiego

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Błażeja Kempiańskiego została wykonana pod kierunkiem naukowym Pana dr hab. Marka Skonecznego w Zakładzie Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Kierowany przez niego zespół od lat prowadzi badania dotyczące biogenezy peroksysomów, a w szczególności mechanizmów importu białek do wnętrza tych struktur.

Problematyka rozprawy doktorskiej dotyczy identyfikacji nowych sekwencji aminokwasowych, które umożliwiają kierowanie białek do peroksysomów. Peroksysomy są organellami, które odgrywają ważną rolę w komórce. Należą one do wysoce adaptacyjnych i wszechstronnych organelli, które pełnią różnorodne funkcje metaboliczne. Funkcjonalność peroksysomów w dużej mierze zależy od właściwego importu białek, które są syntetyzowane na wolnych rybosomach w cytosolu, a tym samym wymagają odpowiedniego mechanizmu identyfikacji oraz transportu do miejsca docelowego. Białka macierzy peroksysomalnej są importowane posttranslacyjnie w stanie złożonym, czasem nawet oligomerycznym, co można uznać za charakterystyczną cechę mechanizmu importu białek peroksysomalnych. Kierowanie białek do peroksysomów zależy od obecności sekwencji kierującej (PTS), która jest rozpoznawana przez receptory PTS znajdujące się w cytosolu. Dane literaturowe wskazują na istnienie dwóch dobrze poznanych sygnałów kierujących białka do wnętrza peroksysomów. Jest to sekwencja PTS1 rozpoznawana przez białko receptorowe Pex5p za pośrednictwem domeny tetratrikopeptydowej (TPR) i sekwencja PTS2, rozpoznawana przez białko receptorowe Pex7p za pomocą domeny WD-40. Receptory PTS przenoszą

ładunek na błonę peroksysomalną, gdzie stają się następnie częścią przejściowych porów importowych, a następnie uwalniają ładunek do światła peroksysomów.

Różnorodność funkcjonalna peroksysomów może stanowić istotny czynnik w adaptacji komórek do różnych warunków środowiskowych. Jest to realizowane między innymi przez zmiany funkcji metabolicznych, a co za tym idzie zmiany składu enzymatycznego tych organelli, dostosowywane do potrzeb komórki. Badania dotyczące tego zagadnienia pokazały, że ta różnorodność funkcjonalna peroksysomów opiera się na skomplikowanej regulacji ekspresji genów i importu białek peroksysomalnych. Pomimo, iż dotychczasowa wiedza na temat importu białek peroksysomalnych jest stosunkowo obszerna, to mechanizm ten nie został w pełni wyjaśniony i wiele ważnych zagadnień wymaga dalszych analiz. Warto w tym miejscu podkreślić, że w niektórych organizmach, w tym również u drożdży *S. cerevisiae*, zidentyfikowano białka, których transport do peroksysomów odbywa się w sposób niezależny od wspomnianych już sygnałów PTS1 i PTS2, choć jest on zależny od receptora Pex5p. Pozwala to na przypuszczenie, że receptor Pex5p wykazuje podwójną funkcję, uczestnicząc również w alternatywnym mechanizmie importu, zależnym od hipotetycznego sygnału PTS3. Przykładem tego typu białek u drożdży jest oksydaza acylo-CoA (AOx) czy też acetylotransferaza karnitynowa (Cat2p), które wykorzystują do transportu N-końców część receptora Pex5p zamiast domeny TPR, która to domena zaangażowana jest w oddziaływanie z sygnałem PTS1.

Rola peroksysomów, początkowo sprowadzana do nieznaczej odpowiedzialności za funkcjonowanie komórki, w miarę rozwoju wiedzy na ich temat, szczególnie w ostatnich latach, okazuje się być dużo bardziej znacząca. Sugeruje to również coraz częściej stosowane określenie, odnoszące się do peroksysomów, że są to wielozadaniowe organelle, które pełnią kluczową rolę w licznych procesach biochemicznych w metabolizmie komórki. Ponadto wszelkiego typu zaburzenia struktury peroksysomów na skutek mutacji i dysfunkcji genów *PEX* bądź też genów kodujących białka związane z biogenezą tych struktur, stanowią podłoże patogenetyczne chorób peroksysomalnych. Argumenty te dowodzą, że podjęta przez Doktoranta tematyka jest aktualna i wpisuje się w potrzebę szczegółowego wyjaśnienia mechanizmu importu białek peroksysomalnych w tym poprzez pokazywanie nowych ścieżek czy też analizę czynników, które poprzez wpływ na import białek mogą modulować aktywność peroksysomów.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie alternatywnego mechanizmu importu białek do peroksysomów. Pomoc w realizacji celu, jaki wyznaczył sobie Pan mgr Błażej Kempieński, stanowiły precyzyjnie sformułowane cele szczegółowe obejmujące: (i) scharakteryzowanie sygnału PTS3 w polipeptydzie jednego z kluczowych białek peroksysomalnych jakim jest oksydaza acylo-CoA oraz (ii) zidentyfikowanie kolejnych białek drożdży *S. cerevisiae*, których transport do wnętrza peroksysomów odbywa się szlakiem zależnym od PTS3. Istotne dla realizacji postawionego celu było również szczegółowe określenie poszczególnych etapów prac badawczych, właściwy dobór metod badawczych oraz dobrze przemyślany układ doświadczalny.

## OCENA MERYTORYCZNA

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Błażeja Kempieńskiego posiada strukturę typową dla prezentacji wyników doświadczalnych i składa się z 8 rozdziałów obejmujących kolejno: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Literatura, Publikacje. Całość rozprawy poprzedzona jest zwięzłym Streszczeniem w języku polskim oraz angielskim przedstawiającym zrealizowane zadania badawcze. Rozprawa doktorska liczy 119 stron, na których znalazło się 29 rycin (9 rycin zamieszczonych zostało w rozdziale „Wstęp”, a pozostałe 20 w rozdziale „Wyniki”), 9 tabel (2 tabele zamieszone zostały w rozdziale „Wstęp”, 6 w rozdziale „Materiały” i 1 w rozdziale „Wyniki”) oraz 235 pozycji literaturowych, z których znaczącą część stanowią prace wydane w ostatnich dziesięciu latach.

**Wstęp** stanowiący logiczne i konsekwentne wprowadzenie czytelnika w zagadnienie, którego dotyczy rozprawa doktorska opisany jest na 21 stronach. W oparciu o stosowną względem tematyki literaturę Doktorant dokonał opisu aktualnej wiedzy na temat peroksyosomów, a w szczególności ich budowy, funkcji czy podstawowych procesów jakie mają miejsce wewnątrz tych struktur jak np.  $\beta$ -oksydacja. Najobszerniej rozdział ten traktuje o imporcie białek do wnętrza peroksyosomów, co nie dziwi, ponieważ odnosi się wprost do tematu rozprawy. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant przedstawiając aktualną wiedzę na temat różnych ścieżek importu białek do peroksyosomów wskazuje również obszary, w których widoczne są niedostatki wiedzy i potrzebę analizy tych zagadnień, czego przykładem może być zacytowany fragment tekstu: „*Natura tego hipotetycznego sygnału, zwanego czasem PTS3 i struktura rejonu Pex5p rozpoznającego ten wewnętrzny sygnał pozostają nieznanne.*” Informacje zawarte we Wstępie, oparte na szerokim zakresie danych literaturowych, przedstawione są w sposób klarowny, a czytelności opisywanym mechanizmom dodają dobrze dobrane ryciny i tabele ułatwiające zrozumienie nie zawsze prostej materii poruszanych zagadnień.

Zaznaczone we Wstępie braki danych literaturowych odnośnie importu białek peroksyosomalnych w sposób niezależny od sygnałów PTS1 i PTS2 stały się inspiracją do podjęcia badań stanowiących podstawę niniejszej rozprawy. Zarówno cel główny rozprawy jak i sformułowane na jego bazie dwa cele szczegółowe, zostały określone w sposób jednoznaczny i są w pełni zgodne z tematem rozprawy doktorskiej. Celem głównym rozprawy było scharakteryzowanie alternatywnego mechanizmu importu białek peroksyosomalnych. W oparciu o ten cel Doktorant sformułował dwa cele szczegółowe: scharakteryzowanie hipotetycznego sygnału PTS3 w polipeptydzie oksydazy acylo-CoA oraz zidentyfikowanie kolejnych białek drożdży *S. cerevisiae*, których transport do wnętrza peroksyosomów odbywa się szlakiem zależnym od PTS3.

Realizacja założonego celu badań została oparta o dobrze przemyślany układ doświadczalny oraz metody i techniki badawcze wykorzystywane w genetyce czy biologii molekularnej. Szczegółowy opis wykorzystanych w badaniach szczepów drożdży *S. cerevisiae*

został zamieszczony w rozdziale **Materiały**. Znajduje się tam wykaz szczepów pochodzących z kolekcji Zakładu Genetyki jak i szczepów skonstruowanych na potrzeby realizacji zaplanowanych badań wraz ze szczegółowym opisem ich konstrukcji. W podobny sposób przedstawiono również wykaz plazmidów wykorzystanych przy realizacji zadań badawczych. W rozdziale tym znalazły się również informacje dotyczące szczepów bakterii wykorzystanych do konstrukcji plazmidów. Opis metod wykorzystanych do realizacji zaplanowanych zadań badawczych przedstawiony został w rozdziale **Metody**. Wśród opisanych metod i technik badawczych znalazły się między innymi: metody wykorzystywane do konstrukcji plazmidów i transformacji komórek drożdży, metody wykorzystywane do konstrukcji haploidalnych i diploidalnych szczepów drożdży, test dwuhybrydowy stosowany w celu identyfikacji reszt aminokwasowych oksydazy acylo-CoA uczestniczących w jej oddziaływaniu z białkiem Pex5<sup>136-292</sup>, mikroskopia fluorescencyjna do analizy wydajności importu do peroksysomów białek wyznakowanych metką GFP, chromatografia powinowactwa do jonów niklu do poszukiwania białek importowanych za pośrednictwem sygnału PTS3 czy też spektrometria mas do identyfikacji białek.

Część doświadczalna pracy została przedstawiona w rozdziale **Wyniki**, gdzie znalazło się szerokie spektrum wykonanych przez Doktoranta analiz. Uzyskane wyniki Doktorant zaprezentował na 20 rycinach i w formie 1 tabeli. Cały cykl badań został podzielony na dwa wątki tematyczne, a prezentacja uzyskanych wyników została usystematyzowana w sposób tworzący pewien logiczny ciąg, zmierzający do uzyskania odpowiedzi na sformułowane pytania, stanowiące jednocześnie cele szczegółowe pracy.

Pierwsza część badań miała na celu ustalenie, które reszty aminokwasowe w polipeptydzie oksydazy acylo-CoA biorą udział w oddziaływaniu z N-końcową częścią białka receptorowego Pex5p i tym samym są istotne dla importu tego białka do peroksysomów. Do opracowania strategii badawczej Doktorant wykorzystał wcześniejsze osiągnięcia naukowe prac zespołu, które wskazywały na współistnienie w Pex5p dwóch domen różniących się specyficznością: domeny oddziałującej z PTS1 i zawierającej powtórzenia TPR oraz domeny zlokalizowanej w obrębie N-terminalnej części receptora. Przy czym zasugerowano, że to właśnie domena zlokalizowana w N-końcowej części receptora Pex5p jest zaangażowana w rozpoznawanie postulowanego sygnału PTS3 i decyduje o imporcie do peroksysomów białek posiadających taki sygnał, czego przykładem jest oksydaza acylo-CoA czy acetylotransferaza karnitynowa (Cat2p). W ramach realizacji tego celu rozprawy doktorskiej Doktorant przeprowadził szereg starannie zaplanowanych badań związanych z identyfikacją reszt aminokwasowych tworzących postulowany sygnał PTS3 oksydazy acylo-CoA. Stosując narzędzie mutagennej reakcji PCR stworzył biblioteki plazmidów kodujących przypadkowo zmienione warianty białka AOx, co pozwoliło mu na uzyskanie puli klonów drożdżowych, zawierających plazmid pGAD424-Pex5p<sup>136-292</sup> oraz pGBT9-AOx z przypadkowo wprowadzoną mutacją w obrębie genu *POX1* (Rys. 12). Szczegółowa analiza wyselekcjonowanych klonów pozwoliła z kolei na identyfikację podstawień aminokwasowych, których efektem było wzmocnienie bądź osłabienie oddziaływania z Pex5p<sup>136-292</sup> (w obrębie fragmentu między 136 a 292 aminokwasem receptora Pex5p) (Tab. 9). Dla sprawdzenia czy podstawienia aminokwasowe

w AOX, zaburzające oddziaływanie z Pex5p mają również wpływ na import AOX do peroksysomów *in vivo*, Doktorant wykorzystał komórki szczepu BY4741 *pex5Δ pox1Δ* komplementowane plazmidami kodującymi natywną lub odpowiednio zmienioną wersją białek fuzyjnych AOX-GFP oraz plazmidem pRS413-Pex5 kodującym receptor Pex5p, a także plazmidem kodującym marker peroksysosomalny mRFP-SKL lub PTS2-dsRed (Rys. 16, 17). Podsumowując tę część badań Doktorant udokumentował, że:

- Reszty aminokwasowe w polipeptydzie oksydazy acylo-CoA uczestniczące w jej oddziaływaniu z N-końcową częścią receptora Pex5p są ważne dla importu tego białka do peroksysomów *in vivo*
- Wskazane reszty aminokwasowe nie tworzą ciągłej sekwencji jak ma to miejsce w przypadku sygnałów PTS1 czy PTS2, a skupione są w dwóch rejonach natywnej struktury trzeciorzędowej tego białka: na powierzchni oraz w otoczeniu cząsteczki FAD, pełniącej rolę kofaktora. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że hipotetyczny sygnał PTS3 odpowiedzialny za kierowanie oksydazy acylo-CoA do peroksysomów zakodowany jest nie tyle w sekwencji aminokwasowej polipeptydu co w strukturze sfałdowanego białka

Druga część badań miała na celu poszukiwanie innych, poza oksydazą acylo-CoA czy acetylotransferazą karnitynową, białek drożdży *S. cerevisiae* importowanych do peroksysomów nową drogą i identyfikację reszt aminokwasowych istotnych dla ich importu, co pozwoliłoby na wyodrębnienie cech wspólnych ich sygnałów PTS3 i sformułowanie ogólnych cech budowy tego sygnału. Punktem wyjścia do poszukiwania takich białek było ustalenie przez Doktoranta kryteriów, które powinno spełniać białko, aby można było uznać, że jego transport odbywa się postulowanym, alternatywnym szlakiem. W tym celu przyjęto następujące warunki: (i) transport białka do peroksysomów wymaga obecności receptora Pex5p, (ii) białko jest transportowane do peroksysomów mimo braku sygnału PTS1, a w przypadku obecności tego sygnału jego usunięcie nie ma wpływu na lokalizację peroksysosomalną, (iii) transport białka do peroksysomów nie wymaga obecności receptora Pex7p, co pozwala na wykluczenie transportu zależnego od sygnału PTS2.

Wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa do jonów niklu Doktorant wytypował nowe białko, zidentyfikowane następnie metodą spektrometrii mas jako Fox2p, które oddziałuje z N-końcowym rejonem receptora Pex5p (Rys. 18-20). Z kolei analizy jakościowe oparte na mikroskopii fluorescencyjnej i wykorzystaniu białka fuzyjnego z metką GFP pozwoliły Doktorantowi na dokładniejsze scharakteryzowanie importu białka Fox2p do peroksysomów (Rys. 21-27) m.in. poprzez analizę wydajności tego procesu ocenianej na podstawie liczby komórek wykazujących kolokalizację białek fuzyjnych z markerem peroksysosomalnym (Rys. 28-29). Podsumowując tę część badań Doktorant udokumentował, że:

- Transport białka Fox2p do peroksysomów jest zależny zarówno od ścieżki PTS1 jak i od hipotetycznej ścieżki PTS3
- Import białka Fox2p do peroksysomów odbywa się niezależnie od mechanizmu „piggy back” opartego na tworzeniu kompleksu z białkiem posiadającym sygnał PTS1 lub PTS2

- W imporcie białka Fox2p do peroksysomów, poza receptorem Pex5p, uczestniczy również receptor Pex9p, a ich udział można oszacować odpowiednio na ok. 90% i 10%
- Import białka Fox2p z udziałem receptora Pex9p nie wymaga sygnału PTS1
- Fox2p jest kolejnym białkiem drożdży *S. cerevisiae* wykorzystującym hipotetyczny sygnał PTS3 do importu do peroksysomów

Wyniki badań stanowiące podstawę przedłożonej przez Doktoranta rozprawy, przeprowadzone z zastosowaniem szeregu nowoczesnych technik i w oparciu o różnorodne podejścia metodyczne, stanowią istotny wkład w poszerzanie wiedzy na temat importu białek peroksysomalnych, co jest niewątpliwie dużym osiągnięciem. Podkreślić również należy, że część z tych wyników znalazła się w pracy opublikowanej w wysokiej rangi czasopiśmie *Journal of Cell Science*, gdzie Pan mgr Błażej Kempieński jest drugim autorem. Wiele z uzyskanych wyników prowokuje do stawiania nowych pytań, a przez to do kontynuacji badań, co sam Doktorant w wielu miejscach podkreśla.

Pracę kończy rozdział **Dyskusja**, gdzie Doktorant dokonuje omówienia uzyskanych przez siebie wyników w świetle dostępnej i aktualnej literatury przedmiotu. W mojej ocenie istotnym uzupełnieniem całości pracy byłoby zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników w formie wniosków, co dałoby czytelnikowi syntetyczny obraz dokonań uzyskanych przez Doktoranta.

Podsumowując, przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny badań. Podjęta w pracy problematyka importu białek do peroksysomów jest aktualna i bardzo istotna, szczególnie jeśli weźmiemy pod uwagę, że zaburzenia w funkcjonowaniu peroksysomów stanowią podłoże wielu schorzeń. Koncepcja pracy jest spójna, a eksperymenty zaplanowane zostały z dużą starannością i znajomością warsztatu metodycznego, co sprzyjało osiągnięciu pozytywnego efektu w rozwiązaniu postawionego problemu badawczego. Co ważne, interpretacja uzyskanych wyników przedstawiana była w sposób jednoznaczny, niewykraczający poza uzyskane dane.

Rozprawa przygotowana została w sposób staranny, choć doktorant nie ustrzegł się drobnych niedociągnięć edytorskich, błędów gramatycznych czy nieścisłości np. str. 62 „...w celu zaindukowania peroksysomów.”, str. 63 „...rozdzielano na żelu akrylamidowym...”, str. 56 oznaczenia stosowane przy zdjęciach na Rys. 16 zapisane są w języku angielskim, na wszystkich pozostałych oznaczenia są one w języku polskim. Te nieliczne uwagi nie wpływają jednak na moją pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy.

### **Pytania problemowe**

Wobec pozytywnej oceny przedstawionej w niniejszej recenzji, nie zgłaszam istotnych zastrzeżeń, które wymagałyby szczegółowego wyjaśnienia ze strony Doktoranta.

Kierując się jednak własnymi zainteresowaniami, chciałabym przedyskutować podczas obrony rozprawy doktorskiej dwie kwestie. Pierwsza dotyczy potencjalnych mechanizmów regulacji poziomu białka Pex5p. Białko Pex5p jako receptor sygnału PTS1 jest ważnym



elementem mechanizmu importu białek do peroksysomów. Stąd mechanizm jego regulacji wydaje się być istotny dla utrzymania właściwej funkcjonalności peroksysomów. Moje pytanie dotyczy zatem sposobu regulacji receptora Pex5p w komórce. Druga kwestia dotyczy natomiast peksofagii będącej selektywną wobec peroksysomów formą autofagii i jej roli w regulacji dynamiki peroksysomów. Czy istnieją dane bądź przesłanki wskazujące na związek między importem białek do peroksysomów a procesem peksofagii?

## WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując, chciałabym stwierdzić iż przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, a zaprezentowane uwagi nie obniżają tej wartości. Uważam zatem, że rozprawa doktorska Pana mgra Błażeja Kempieńskiego spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z kolejnymi poprawkami). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgra Błażeja Kempieńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie doceniając wysoką wartość naukową rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.



dr hab. Renata Zadrąg-Tęcza, prof. UR