



UNIwersytet GDAŃSKI



Dr hab. Rafał Dutkiewicz, prof. UG
Pracownia Biochemii Ewolucyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUM-ed
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk
tel. 58 523 6351
email: rafal.dutkiewicz@ug.edu.pl

Gdańsk, 10.11.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kowalskiego

pt. „Pozamitochondrialne czynniki wpływające na import i degradację białek mitochondrialnych”

wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Agnieszki Chacińskiej oraz promotora pomocniczego Dr Piotra Brągoszewskiego z Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego

Mitochondria uczestniczą w wielu niezwykle ważnych procesach biologicznych, takich jak wytwarzanie energii, biosynteza centrów żelazo-siarkowych i hemu, sygnalizacja komórkowa, specjalizacja, wzrost i śmierć komórki, czy też kontrola cyklu komórkowego. Proteom mitochondrialny, czyli zestaw wszystkich białek obecnych w mitochondriach, jest współtworzony przez około tysiąc białek, z których przytłaczająca większość powstaje w cytozolu na bazie matrycy genomowego DNA. W związku z tym większość białek mitochondrialnych jest importowana z cytoplazmy. Podstawową rolę w tym procesie odgrywają kompleksy białkowe zlokalizowane w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ich składniki rozpoznają importowane białka jak i umożliwiają ich translokację przez błony lub ich wbudowanie w błony. Dynamiczna natura obu typów translokaz pozwala na sortowanie białek o odmiennych mechanizmach importu. Poza tym istotną rolę w imporcie odgrywają białka zlokalizowane w cytoplazmie, przestrzeni międzybłonowej i matriks mitochondrialnej. Zakłócenia w imporcie białka do mitochondriów mogą stanowić przyczynę nowej klasy chorób pochodzenia mitochondrialnego, co potwierdza kluczowe znaczenie procesu importu białka dla prawidłowego działania mitochondriów.

Aby zachować komórkową homeostazę, syntezie i transportowi białek towarzyszą systemy kontroli jakości. Systemy takie mogą usuwać źle sfałdowane lub nieprawidłowo zlokalizowane białka. Selektywną degradację tych białek zapewnia między innymi system ubikwityna-proteasom



UNIwersytet Gdański



(ang. Ubiquitin proteasome system, UPS). Wiele przesłanek wskazuje, że pula białek kierowanych do mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej (ang. Intermembrane space of mitochondria, IMS) może być degradowana właśnie przez UPS. Procesy odpowiedzialne za import i dojrzewanie białek oraz ich degradację nie powinny być rozpatrywane w oderwaniu od siebie. Uczestniczą one bowiem w tworzeniu równowagi i zaburzenie któregośkolwiek z procesów wpływa na pozostałe.

Pan mgr Łukasz Kowalski, realizując projekt doktorski, przeprowadził analizy właśnie w kontekście wielostronnych zależności w obrębie całej komórki. Jako przedmiot badań Doktorant wybrał białko Cox12, które reprezentuje białka IMS. Celem badań było zidentyfikowanie czynników decydujących o ubikwitynacji białka Cox12, zarówno zewnętrznych (enzymy zaangażowane w proces ubikwitynacji) oraz wewnętrznych (właściwości białka Cox12 niezbędne dla jego ubikwitynacji). Ta część badań objęła również wzajemny wpływ procesów ubikwitynacji i importu. Otrzymane wyniki pozwoliły Autorowi na rozpoczęcie kolejnej części projektu, w której badał konsekwencje importu do mitochondriów białek posiadających domeny o trwałej strukturze trzeciorzędowej. W celu odtworzenia takich warunków w komórkach drożdży mgr Łukasz Kowalski przeprowadził ekspresję białka fuzyjnego kierowanego do mitochondriów, które zawierało w swojej sekwencji stabilnie sfalowaną domenę białka zielonej fluorescencji.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 123 strony i została napisana w języku angielskim. Praca ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Rozpoczyna się spisem treści, streszczeniem po angielsku i po polsku, wstęp liczy 11 stron. Po sprecyzowaniu jakie są główne cele pracy znajduje się liczący 10 stron rozdział „Materiały i Metody”. Wyniki liczą 48 stron, a po nich następuje 18 stronicowa dyskusja oraz konkluzje, które podsumowują główne osiągnięcia Autora podczas realizacji projektu doktorskiego. Rozprawa kończy 10 stronicowym załącznikiem obejmującym tabele oraz 15 stronicowym piśmiennictwem.

Ocena merytoryczna

Wstęp Autor rozpoczyna od ogólnego omówienia struktury, roli mitochondrii oraz proteomu tych organelli. Następnie przechodzi do bardziej szczegółowej charakterystyki importu białek do mitochondriów ze szczególnym naciskiem na omówienie maszyneryi białkowych zaangażowanych w ten proces. Biogeneza białek mitochondrialnych jest szczególnie złożona, ponieważ mitochondria posiadają dwie błony, zewnętrzną (OM, ang. *outer membrane*) i wewnętrzną (IM, ang. *inner*



membrane), które oddzielają od siebie przestrzeń międzybłonową (IMS, ang. *intermembrane space*) i macierz mitochondrialną. Pierwszy kompleks białkowy, który Doktorant opisuje to kompleks translokazy zewnętrznej błony mitochondrialnej (TOM, ang. *translocase of the outer mitochondrial membrane*), który jest zaangażowany w przenoszenie prekursorów białek przez błonę zewnętrzną OM. Następnie przechodzi do opisu ścieżek sortowania białek w mitochondriach, niemniej głównie nacisk stawia na dokładną charakterystykę maszynarii białkowych zaangażowanych w transport białek do przestrzeni międzybłonowej IMS. Z tego też względu w pracy znajduje się wyczerpujący opis strukturalno-funkcjonalny maszynarii białkowej przestrzeni międzybłonowej (MIA, ang. *mitochondrial IMS import and assembly machinery*) oraz kompleksu translokazy wewnętrznej błony mitochondrialnej (TIM23, ang. *inner membrane presequence translocase*).

W dalszej części wstępu Autor opisał mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę jakości w mitochondriach, które pozwalają na wykrycie uszkodzonych, nieprawidłowo sfałdowanych lub źle zlokalizowanych białek. W tej części wstępu Doktorant skoncentrował się na jednym z podstawowych systemów komórki pozwalających na demontaż nieprawidłowych białek, a mianowicie na systemie ubikwityna-proteasom. Proteasom to kompleks odpowiedzialny za degradację białek. Natomiast białka przeznaczone do zniszczenia znakowane są poprzez doczepienie cząstek ubikwityny. Badania wielu zespołów badawczych, w tym zespołu Prof. Agnieszki Chacińskiej i Dr Piotra Brągoszewskiego, wskazują że system ubikwityna-proteasom sprawuje ścisłą kontrolę nad nowymi białkami które są w drodze do swojego miejsca przeznaczenia. Nie mam żadnych uwag do tej części rozprawy, jest napisana w sposób wyczerpujący, absolutnie czytelny i zrozumiały. Jedyna moja sugestia jest taka, że Autor mógł poprzeć swoje rozważania większą ilością prostych schematów, które ułatwiłyby zrozumienie opisanych, często bardzo skomplikowanych procesów.

Cele pracy są precyzyjne i jasno postawione

Rozdział **Materiały i metody** składa się z dwóch po sobie następujących podrozdziałów (podrozdział Materiały i podrozdział Metody), które w sposób jasny i bardzo szczegółowy przedstawiają opisy materiałów i metod wykorzystywanych w pracy doktorskiej. Dokładne i rozbudowane opisy przeprowadzonych doświadczeń dodatkowo podkreślają duży wysiłek włożony przez Doktoranta w realizację projektu badawczego. Przygotowane opisy z pewnością umożliwią ewentualne powtórzenie doświadczeń bez większych trudności. Na szczególne uznanie zasługuje także fakt, że Doktorant posługiwał się szeroką gamą metod badawczych.



UNIwersytet Gdański



Rozdział **Wyniki** został starannie przygotowany oraz dobrze udokumentowany rysunkami. Do najważniejszych wyników otrzymanych przez mgr Łukasza Kowalskiego zaliczam :

- Wykazanie, że osłabienie importu białka Cox12 do mitochondriów powoduje jego zwiększoną ubikwitynację.
- Wykazanie, że białka Ubc4 (enzym E2) oraz Rsp5 (ligaza ubikwitynowa) biorą udział w ubikwitynacji Cox12.
- Pokazanie na przykładzie białka Cox12, że przyłączenie ubikwityny do białka prekursorowego może uniemożliwić jego import do mitochondriów.
- Pokazanie w oparciu o modelowe białko fuzyjne z wprowadzoną domeną o trwałej strukturze trzeciorzędowej, że taka domena powoduje blokadę importu oraz utknięcie białka na etapie mitochondrialnych translokaz, co z kolei prowadzi do uogólnionego zaburzenia procesu importu.
- Wytypowanie potencjalnych białek zaangażowanych w odpowiedź komórkową na zablokowanie mitochondrialnych kanałów importu oraz potwierdzenie że również w tym przypadku, niezwykle istotną rolę odgrywa system ubikwityna-proteasom.

Dyskusja jest napisana bardzo dobrze. Autor umiejętnie dyskutuje swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe, a tytuły podrozdziałów jeszcze raz podkreślają najistotniejsze badane problemy.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka pytań do dalszej dyskusji

Na wstępie mam pytanie o szczegół techniczny metody (strona 23): Dlaczego podczas doświadczeń, w których badano inhibicję proteasomu z wykorzystaniem inhibitora MG132 zmodyfikowano pożywkę minimalną – nie dodawano siarczanu amonu, tylko 0,1% prolinę oraz 0,003 % roztwór SDS? Czy zmiana ta jest podyktowana właściwościami chemicznymi inhibitora MG132?

Drożdże z delecją genu *COX12* tracą zdolność wzrostu na pożywce zawierającej glicerol jako źródło węgla, defekt ten może być komplementowany poprzez ekspresję dzikiej formy Cox12_{FLAG}. Niemniej wzrost jest mniej efektywny niż szczepu dzikiego drożdży (strona 36, rysunek 4B). Czy efekt ten może być spowodowany obecnością znacznika FLAG w obrębie białka Cox12? Czy sprawdzano jak ekspresja Cox12 bez znacznika komplementuje delecję *COX12* ?

Niższy poziom zmutowanych wersji białka Cox12 z wprowadzonymi mutacjami w obrębie czterech cystein jest konsekwencją zwiększonej ubikwitynacji takich wariantów białka i dalej ich degradacji przez proteasom. Pan Łukasz Kowalski w doświadczeniu z inhibitorem MG132 jednoznacznie



wykazał, że w jego obecności poziom białek Cox12 z mutacjami w obrębie pojedynczych cystein wraca do poziomu białka typu dzikiego, niemniej w przypadku białka Cox12 C-FREE ten efekt jest tylko połowiczny (strona 41, rysunek 8). Jak Doktorant może wytłumaczyć ten wynik?

Czy planowane są dalsze badania, których celem będzie identyfikacja, które reszty lizyny w obrębie białka Cox12 ulegają ubikwitynacji? Czy możliwe byłoby przeprowadzenie tego typu analiz na oczyszczonych białkach?

W drożdżach z delecją genu *UBC4* zaobserwowano wyraźny wzrost poziomu natywnego białka Cox12 głównie w temperaturach 19°C i 28°C, efekt ten nie jest tak znaczny w temperaturze 37°C (strona 49, rysunek 15A). Czy autor ma jakąś hipotezę, która wyjaśniałaby mniejszą akumulację Cox12 w 37°C?

Czy eksperymenty cytometrii przepływowej, których wyniki zostały przedstawione na rysunku 24 (strona 60) oraz rysunku 30 (strona 68) zostały wykonane w biologicznych powtórzeniach? Nie zostały podane odchylenia standardowe.

Czy istniały jakieś szczególne przesłanki, które kierowały Doktorantem, że wybrał akurat białka Mdj1, Rip1, Cox4, Atp20, Qcr6, Qcr8, Cor1, Cox8 do tworzenia fuzji z fragmentem tFT lub sfGFP?

Praca pozwoliła na wytypowanie potencjalnych białek zaangażowanych w odpowiedź komórkową na zablokowanie mitochondrialnych kanałów importu. Czy do takiego defektu często dochodzi w komórce? Czy Doktorant, w oparciu o wytypowane cytozolowe białka, mógłby pokusić się o zaproponowanie roboczego modelu odpowiedzi komórkowej na tego typu zaburzenie?

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana w zrozumiały sposób i poprawnym językiem. Od strony edytorskiej jest przygotowana bardzo starannie. Nie znalazłem żadnych niezgrabnych sformułowań, czy większych pomyłek w rycinach, czy w tekście. Z mniejszych pomyłek wskazałbym na następujące błędy:

1. "...the detailed mechanism of the ubiquitination of such proteins remained **known**." (strona 6), a powinno być "...the detailed mechanism of the ubiquitination of such proteins remained **unknown**."
2. "Isolated mitochondria were flash **frozen**..." (strona 24), a powinno być "...flash **frozen**...";
3. "... overexpression of **newly** created fusion proteins..." (strona 59), a powinno być "...overexpression of **newly** created fusion proteins...";
4. "...only very small fraction of **theprecursor** protein is exposed..." (strona 82), a powinno być "...only very small fraction of **the precursor** protein is exposed...";



UNIwersytet GDAŃSKI



5.“...the levels of the control protein (Rps29a) were almost equal (Fig. 34 and Fig. 34). (strona 93),

a rozumiem, że powinno być “...the levels of the control protein (Rps29a) were almost equal (Fig. 33 and Fig. 34).

6.Zdjęcia z mikroskopii konfokalnej nie zawierają skali (strona 55, rysunek 20A)

Podsumowanie

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca jest na bardzo dobrym poziomie. Poszczególne eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób przemyślany, a otrzymane wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań. Część badań zostało opublikowanych w bardzo dobrym czasopiśmie z listy filadelfijskiej jakim jest BMC Biology. Autor rozprawy w dojrzały naukowo sposób podchodzi do otrzymanych rezultatów, a na ich podstawie wyciąga racjonalne wnioski, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Autora do pracy naukowej, o umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kowalskiego „Pozamitochondrialne czynniki wpływające na import i degradację białek mitochondrialnych” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki określone stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie mgr Łukasza Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Bazując na wysokiej jakości badań opisanych w rozprawie, chciałbym zgłosić rozprawę mgr Łukasza Kowalskiego do wyróżnienia przez Radę Naukową Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Rafał Dutkiewicz

Rafał Dutkiewicz