

Wrocław, 30 października 2020 r.

**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 dr Piotra Brągoszewskiego w Laboratorium  
Biologii Mitochondriów - Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu  
Warszawskiego**

Kontrola jakości białek za pośrednictwem szlaku ubikwityna-proteasom jest podstawowym mechanizmem zapewniającym homeostazę komórek. Zaburzenia degradacji białek, które nie uległy translokacji do docelowego kompartmentu, nie zostały na czas usunięte lub zostały źle sfałdowane i wykazują właściwości agregacyjne, mogą prowadzić do przyspieszonego starzenia, niekontrolowanej proliferacji, dysfunkcji czy nawet śmierci komórek. Zaburzenia proteostazy są również przyczyną wielu chorób człowieka, w tym neurodegeneracyjnych, nowotworowych i chorób serca, stąd też dogłębne poznanie mechanizmów kontroli jakości białek we wszystkich aspektach ma nie tylko znaczenie poznawcze, ale także medyczo-aplikacyjne. Stosunkowo mało wiadomo na temat mechanizmów degradacji prekursorowych białek mitochondrialnych i znaczenia tego procesu w różnych warunkach fizjologicznych i stresowych oraz w relacji do procesu importu białek do mitochondriów i funkcjonalności samych mitochondriów. Warto podkreślić, że obecnie temat ten jest intensywnie badany w wielu ośrodkach na świecie. Grupa prof. Agnieszki Chacińskiej wykazała wcześniej, że prekursorzy mitochondrialnych białek przeznaczonych do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów ulegają ubikwitynacji i degradacji w proteasomie, zarówno w warunkach zaburzeń importu białek do mitochondriów jak i w warunkach

fizjologicznych, co sugeruje istotną rolę szlaku ubikwityna-proteasom w regulacji poziomu tych białek (Bragoszewski i wsp., Mol Cell Biol, 2013). W kolejnej publikacji (Wróbel i sp., Nature, 2015) wykazano, że akumulacja mitochondrialnych białek prekursorowych w cytosolu wywołuje stres komórkowy, który aktywuje globalną odpowiedź na poziomie transkryptomu i proteomu skutkująca inhibicją syntezy białek i zwiększeniem aktywności szlaku ubikwityna-proteasom. Efektem tej odpowiedzi jest z jednej strony zmniejszenie syntezy nowych białek prekursorowych, a z drugiej strony szybsza degradacja źle zlokalizowanych białek mitochondrialnych.

Kontynuując badania nad mechanizmami kontroli jakości białek mitochondrialnych mgr Łukasz Kowalski postanowił zbadać mechanizm ubikwitynacji modelowego białka Cox12, które jest importowane z cytosolu do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorant udowodnił, że Cox12 podlega ubikwitynacji, a proces ten zależy m.in. od enzymu koniugującego ubikwitynę E2 Ubc4 oraz ligazy ubikwityny E3 Rsp5, przy czym poziom ubikwitynacji Cox12 zwiększa się w sytuacji obniżenia jego importu do mitochondriów, co wykazano dla wariantów Cox12 ze zmutowanymi resztami cysteiny. Ponadto mgr Łukasz Kowalski odkrył, że połączenie Cox12 z ubikwityną blokuje import białka fuzyjnego do mitochondriów, co sugeruje, że naturalnie ubikwitynowane białka prekursorowe również nie są wydajnie importowane do mitochondriów ze względu na zablokowanie kanału translokacyjnego przez cząsteczkę ubikwityny. Obserwacja ta podsunęła też pomysł, aby zbadać komórkową odpowiedź na zahamowanie importu do mitochondriów, poprzez zablokowanie translokatorów dzięki ekspresji białka fuzyjnego b2-tFT zawierającego fragment białka cytochromu b2 z presekwencją kierującą do translokatora TIM23 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz C-końcowego fragmentu tFT zawierającego domenę wolno fałdującego się białka mCherry oraz wariantu GFP (tzw. superfolder GFP) o szybko fałdującej się i bardzo stabilnej strukturze trzeciorzędowej. W pierwszej serii eksperymentów doktorant ekspymował białko b2-tFT w kilkudziesięciu wyselekcjonowanych mutantach delecyjnych pozbawionych znanych białek związanych z procesami proteostazy w celu zbadania wpływu zablokowania translokatorów mitochondrialnych na wzrost komórek mutantów oraz zmierzenia w nich stabilności białka b2-tFT. Dodatkowo przeprowadzono analizę proteomiczną w celu identyfikacji interaktomu b2-tFT.

Uzyskane przez doktoranta wyniki pozwoliły na wytypowanie szeregu białek zaangażowanych w eliminację skutków zatkania translokatorów w mitochondriach lub/i ich odblokowania. Wśród zidentyfikowanych kandydatów są m.in. białka szlaku ubikwityna-proteasom, białka opiekuńcze oraz białka zaangażowane w mitofagię.

Praca została napisana w języku angielskim, stylem naukowym, czyta się ją bardzo dobrze, a pod względem edytorskim jest bez zarzutu. Rozprawę otwiera dosyć krótki 11-stronicowy wstęp z zaledwie jedną ryciną, w którym doktorant opisał szlaki importu białek do mitochondriów, podstawy działania szlaku ubikwityna-proteasom oraz aktualny stan wiedzy o roli tego szlaku w kontroli jakości białek mitochondrialnych. W szerszym kontekście opisu proteostazy w relacji do mitochondriów zabrakło mi chociaż krótkiego omówienia roli mitochondriów w degradacji białek cytosolowych, mechanizmów tworzenia pęcherzyków z mitochondriów oraz mitofagii. W tym rozdziale brakuje mi także schematów ilustrujących szlak importu i dojrzewania białek przestrzeni międzybłonowej mitochondriów czy też mechanizmy degradacji prekursorów białek mitochondrialnych w cytosolu. Zamieszczenie takich rycin znacznie ułatwiłoby lekturę tego rozdziału i zrozumienie omawianych mechanizmów kontroli jakości białek mitochondrialnych. Cele pracy zostały precyzyjnie sformułowane i w pełni odpowiadają tematowi rozprawy. W rozdziale zatytułowanym Materiały i Metody opisano dokładnie i wyczerpująco wszystkie zastosowane materiały i procedury badawcze z wyjątkiem metody cytometrii przepływowej, w opisie której zabrakło informacji w jaki sposób były przygotowywane próbki komórek do pomiarów w cytometrze przepływowym.

Uzyskane wyniki zostały starannie opisane i zaprezentowane w postaci dobrze zaprojektowanych rycin. Eksperymenty wykonano z użyciem niezbędnych kontroli, a uzyskane dane są wysokiej jakości. Użycie szerokiego zestawu nowoczesnych metod i rozwinięcie nowych narzędzi badawczych pozwoliło doktorantowi na uzyskanie wielu interesujących wyników i wysunięcie daleko idących wniosków. W tej części zabrakło mi jednak kilku elementów, które, jak się domyślam, nie zostały wykonane albo z powodu braku czasu albo były wykonane przez inną osobę z zespołu.

Pierwsza część wyników dotycząca analizy ubikwitynacji białka Cox12 powinna być uzupełniona o pomiary szybkości degradacji/czasu półtrwania białek analizowanych wariantów Cox12 ze zmutowanymi resztami cysteinowymi

i lizynowymi w porównaniu do białka typu dzikiego po zastosowaniu inhibitora syntezy białek. Wyniki takiej analizy dla wariantów Cox12 ze zmutowanymi wszystkimi resztami cysteiny lub lizyny w komórkach typu dzikiego oraz mutantów *ubc4* i *rsp5-19* zamieszczono w publikacji Kowalski i wsp. (BMC Biology, 2018). Taki dopiero komplet wyników pozwala w pełni na udowodnienie roli ubikwitynacji w degradacji Cox12. Ponadto w przypadku białka wariantu Cox12-C-Free, którego poziom jest niezwykle niski, prawie niewykrywalny na blotach pokazanych w pracy, zacząłem się zastanawiać czy ekspresja tego białka nie jest defektywna. Dopiero analizy Western blot z publikacji przekonały mnie, że Cox12-C-Free powstaje w komórce, ale jest wysoce niestabilne. Chociaż dalej się zastanawiam czy tak niski poziom tego białka jeszcze przed dodaniem cykloheksymidu można tłumaczyć wyłącznie jego degradacją, zwłaszcza gdy wersja niezmutowana po dodaniu DTT ulega równie szybkiej proteolizie?

Doktorant próbował też zidentyfikować miejsca ubikwitynacji w białku Cox12. Wprowadzenie pojedynczo czterech z siedmiu reszt lizyn do sekwencji mutantu pozbawionego wcześniej wszystkich reszt lizynowego nie spowodowało przywrócenia ubikwitynacji. Rozwiązanie tego problemu wymagałoby utworzenia mutantów wielokrotnych w różnych kombinacjach, co mogłoby doprowadzić do identyfikacji reszt lizyn, które podlegają ubikwitynacji. Rozumiem, że jest to pracochłonne, ale byłoby ważne w kontekście uzyskania pełnego obrazu mechanizmu ubikwitynacji i degradacji białek mitochondrialnych w cytosolu. W przypadku uzyskanych przez doktoranta wariantów Cox12 zawierających pojedyncze reszty lizyny, można by np. zbadać czy nie zmniejsza się stabilność tych białek w porównaniu do hiperstabilnego wariantu Cox12-K-Free po dodaniu cykloheksymidu i DTT. Mógłby to być bardziej czuły test niż wykrywanie ubikwitynowanych form białka.

Szkoda również, że doktorant nie podjął próby zbadania jak ligaza ubikwityny Rsp5 rozpoznaje Cox12 jako substrat albo przynajmniej przedyskutował ten wątek w ostatnim rozdziale. Na przykład czy mogłyby mieć w tym udział białka adaptorowe dla Rsp5 z rodziny arestyn, które wchodzi w interakcje z kwaśnymi łańkami w sekwencji substratów? Co ciekawe Cox12 zawiera dwie takie kwaśne łańki: 3-DQE-5 i 68-DD-69. Z drugiej strony wykazano, że w warunkach stresu cieplnego źle sfałdowane białka ulegają ubikwitynacji przez Rsp5 w czym pośredniczy białko opiekuńcze Ydj1, zawierające motyw PY, jako białko adaptorowe dla ligazy ubikwityny (Fang et

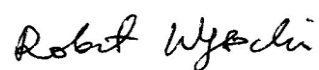
al., Nat Cell Biol. 2014; 16: 1227–1237). Jak wykazał doktorant w badaniach proteomicznych białko Ydj1 wchodzi w interakcje z białkiem fuzyjnym b2-tFT, co moim zdaniem mogłoby sugerować rolę Ydj1 w kontroli jakości białek mitochondrialnych i jest bardziej prawdopodobne niż rola w tym procesie arestyn, które regulują ubiquitynację białek błonowych. Szkoda, że nie podjęto takiego wątku w pracy, co stanowiłoby też walidację interaktomu białka b2-tFT.

Ostatni mój komentarz do tej części pracy dotyczy sposobu przedstawienia wyników poziomu fluorescencji GFP i mCherry białek fuzyjnych tFT i b2-tFT w komórkach drożdży przy pomocy cytometrii przepływowej (ryc. 24 i 30). Aby w pełni ocenić poprawność uzyskanych wyników musiałbym zobaczyć przykładowe (np. dla jednego panelu Ryc.24A) dwuwymiarowe wykresy odczytów poziomu zielonej i czerwonej fluorescencji z zaznaczeniem zbiorów punktów odpowiadający komórkom bez fluorescencji, pozytywnych dla GFP oraz pozytywnych dla GFP i mCherry. I ostatnie pytanie: czy pisząc o braku importu Cox12-C-Free autor miał na myśli efekt retrotranslokacji z powodu braku interakcji tego wariantu z Mia40 i nieutworzenia mostków disiarczkowych czy z defektu importu przez błonę zewnętrzną z cytosolu do przestrzeni międzybłonowej?

Dyskusja pracy jest obszerna, wielowątkowa i dojrzała. Jednakże w dużej części stanowi omówienie wyników i powtórzenie treści zawartych w rozdziale Wyniki. Ta część mogłaby być znacznie skrócona na rzecz poruszenia innych wątków, takich jak możliwy mechanizm rozpoznawania białek mitochondrialnych przez ligazę Rsp5. Doktorant uzyskał w pracy wyniki sugerujące, że białka prekursorowe w formie ubiquitynowanej nie są importowane do mitochondriów ze względu na zbyt duże rozmiary ubiquityny. W związku tym chciałbym poprosić doktoranta o komentarz do pracy autorstwa Lavie i wsp. (Ubiquitin-Dependent Degradation of Mitochondrial Proteins Regulates Energy Metabolism. Cell Rep. 2018 Jun 5;23(10):2852-2863), w której pokazano, że import ubiquityny do mitochondriów w komórkach ludzkich jest możliwy, podobnie jak proces ubiquitynacji i degradacji białek w tych organellach. Podobnie jak w przypadku „Wstępu” brakuje mi schematu/modelu w postaci ryciny, która w sposób syntetyczny podsumowałaby uzyskane w pracy nowe dla nauki dane.

## **Wniosek końcowy**

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska w pełni odpowiada ustawowym wymogom stawianym rozprawom doktorskim, uzyskane wyniki stanowią cenny wkład w wiedzę na temat kontroli jakości białek mitochondrialnych oraz otwierają nowe kierunki badań w tym zakresie. W związku z powyższym składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN o dopuszczenie mgr. Łukasza Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Robert Wysocki