

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN

Poznań, 30.05.2022

Zakład Proteomiki Biomedycznej

E-mail: magdału@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Moniki Mazur pt. „Organizacja mitochondrialnego kompleksu importowego TOB/SAM u śluzowca *Dictyostelium discoideum* w procesie tworzenia wczesnych struktur wielokomórkowych”

Praca doktorska mgr Moniki Mazur składa się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac w tym dwóch artykułów oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem, na uwagę zasługuje również fakt, że Doktorantka kierowała projektem Preludium przyznanym przez Narodowe Centrum Nauki.

Badania przedstawione w pracy dotyczą kompleksu TOB/SAM zlokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Celem dysertacji była weryfikacja hipotezy zakładającej istnienie związku między wielokomórkowością a organizacją kompleksu TOB/SAM z wykorzystaniem śluzowca *Dictyostelium discoideum*. Ten bardzo ciekawy organizm charakteryzuje się złożonym cyklem życiowym, obejmującym zarówno etap jednokomórkowy, jak i etapy wielokomórkowe. W sprzyjających warunkach środowiska i stałym dostępie do pożywienia, jego komórki dzielą się cyklicznie w wyniku mitozy, utrzymując fazę jednokomórkową. Natomiast w warunkach stresu głodowego następuje przełączenie do fazy wielokomórkowej, w trakcie której komórki migrują, tworząc początkowo grupy komórek, co rozpoczyna fazę agregacji. Następnie, ruch komórek staje się bardziej uporządkowany (faza strumieni) i rozpoczyna się proces różnicowania komórek. Część z nich zostanie przekształcona w tzw. ciało owocujące, inna część utworzy spory, które wypełnią ciało owocujące i umożliwią przetrwanie śluzowca w niesprzyjających warunkach. Aby zweryfikować postawioną hipotezę Doktorantka podjęła się zadania ustalenia składu podjednostkowego kompleksu TOB/SAM na różnych etapach rozwoju śluzowca, włączając fazę jednokomórkową oraz dwie wczesne fazy wielokomórkowe tj. fazę agregacji i fazę strumieni.

W pierwszej z zaprezentowanych prac, Doktorantka wyizolowała mitochondria pochodzące z trzech faz cyklu życiowego śluzowca (jednokomórkowej, agregacji i strumieni), dokonała ich separacji metodą elektroforezy natywnej i stosując technikę western blot oraz immunodetekcję z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko Tob55/Sam50 śluzowca oraz ludzkiej metaksynie, zidentyfikowała dwie formy kompleksu TOB/SAM o masach 160 i 600 kDa oraz potwierdziła występowanie obu białek

w mitochondriach komórek niezależnie od fazy cyklu życiowego. Co ciekawe, Doktorantka zidentyfikowała białko Tob55/Sam50 w obu formach kompleksu TOB/SAM, natomiast obecność metaksyny tylko w większej formie kompleksu (600 kDa). Również inne białka zostały zidentyfikowane w kompleksach, między innymi białka Tom40 (kompleks 600 kDa) i Mdm10 (kompleks 160 kDa) oraz mitofiliny (oba kompleksy). Białka Tom40 i Mdm10 obecne były we wszystkich badanych fazach cyklu życiowego. Obecność mitofiliny charakterystyczna była tylko dla fazy jednokomórkowej. Wszystkie eksperymenty zaplanowano prawidłowo, obecność białek potwierdzono z zastosowaniem kilku różnych technik, w związku z tym uzyskane wyniki nie budzą żadnych wątpliwości. Mam jednak pytanie do Doktorantki o zastosowaną w metodzie western blot kontrolę w postaci tzw. loading control stanowiącą 25 kDa prążek wybarwiony barwnikiem CBB. Czy nie właściwsze byłoby zastosowanie przeciwciała przeciwko wybranemu markerowi mitochondrialnemu o w miarę konstytutywnej ekspresji?

W kolejnym zaprezentowanym w dysertacji artykule Doktorantka poszła o krok dalej i wykonała porównawczą analizę proteomiczną całych mitochondriów wyizolowanych z komórek będących w różnych fazach. Zidentyfikowała 294 białka mitochondrialne, które zaklasyfikowała do 9 grup funkcjonalnych. Wśród nich były m. in. białka biorące udział w imporcie białek, ekspresji genów mitochondrialnych, reakcjach redoks czy cyklu Krebsa. Kategorie te zostały przypisane do wszystkich badanych faz rozwojowych. Przeprowadzona analiza ilościowa zidentyfikowanych białek wykazała m.in., że akumulacja dwóch białek importowych: białka Q z rodziny białek przenoszących substraty i mtHsp70, wzrasta kiedy komórki przechodzą z fazy jednokomórkowej do fazy strumieni. Przejście do początkowych etapów rozwoju wielokomórkowego związane było również ze wzrostem poziomu akumulacji ligazy bursztynianowo-CoA i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej biorących udział w cyklu Krebsa, czy kinazy acetyloglutaminianowej, transaminazy kwasu γ -aminomasłowego i Hsp70 zaangażowanych w metabolizm białek. Zidentyfikowano także kilka białek, których poziom akumulacji spadał po przejściu do fazy strumieni. Jednak, co zastanawiające, i w tym wypadku były to białka zaangażowane w cykl Krebsa czy metabolizm białek przez co trudno jest wnioskować czy wspomniane procesy/szlaki ulegają aktywacji czy też raczej zahamowaniu po przejściu do fazy strumieni. Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej zidentyfikowanych białek, Doktorantka ujawniła istotne różnice w stanie funkcjonalnym mitochondriów pochodzących z komórek będących w różnym stadium rozwoju. Różnice te mogłyby być związane z zahamowaniem procesu β -oksydacji, cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej oraz przyspieszeniem metabolizmu aminokwasów, które stanowią paliwo energetyczne do procesu glukoneogenezy podczas głodu. Uzyskane wyniki mogą potwierdzać, że w czasie adaptacji do stresu głodu następuje przeprogramowanie metaboliczne komórek i uruchomienie alternatywnych źródeł pozyskiwania energii. Mam jednak pytania odnoszące się do tych analiz? W jaki sposób wykonano przypisanie poszczególnych białek do odpowiednich kategorii funkcjonalnych? Czy

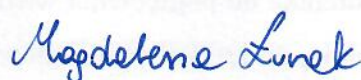
wykonano analizę GO (Gene Ontology)? Czy podjęto próby przeprowadzenia funkcjonalnej analizy bioinformatycznej z uwzględnieniem testów nadreprezentacji/wzbogacenia zidentyfikowanych kategorii? Czy potwierdzono zmieniony poziom zidentyfikowanych białek z użyciem metod alternatywnych? Ile razy wykonano analizę LC-MS/MS na badanych próbkach? Jaka była wariancja wyników pomiędzy poszczególnymi eksperymentami LC-MS/MS?

Co niezwykle ważne, w omawianym artykule wyniki uzyskane z użyciem spektrometrii mas zostały również uzupełnione przez analizy funkcjonalne komórek będących w różnych fazach rozwojowych. Doktorantka wykonała pomiary zużycia tlenu w nietkniętych komórkach przeprowadzone w obecności inhibitora syntazy ATP i tzw. rozpręgacza. Mgr Mazur stwierdziła, że w mitochondriach komórek będących w fazie jednokomórkowej synteza ATP zachodziła na wyższym poziomie, niż w kolejnych fazach rozwoju. Ujawniono również różnice dotyczące pojemności sprzężenia oraz rezerwowej pojemności oddechowej. Obniżenie wartości rezerwowej pojemności oddechowej w fazie strumieni w porównaniu z fazą jednokomórkową oraz podwyższenie wartości tego parametru w fazie agregacji w porównaniu z fazą jednokomórkową, może potwierdzać uzyskane wyniki analizy proteomicznej sugerujące zachodzącą adaptację do głodu poprzez metaboliczne przeprogramowanie komórek.

Trzecia praca wchodząca w skład dysertacji doktorskiej ma charakter artykułu przeglądowego. Doktorantka przedstawia w niej opis struktury i właściwości kanałów importu błony zewnętrznej, w tym budowę kompleksu TOB/SAM. Otrzymujemy również obszerne informacje na temat mechanizmu importu białek, RNA oraz innych związków przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Artykuł jest bardzo dobrze i jasno napisany, jednak w mojej opinii trochę brakuje w nim nawiązania do metodologii, którą stosowała Doktorantka do pogłębienia wiedzy na temat kompleksu TOB/SAM. Ta kwestia wydaje mi się istotna, szczególnie, że artykuł przeglądowy został opublikowany jako ostatni. Nawiązanie metodyczne do własnych badań i dyskusja czy zastosowane techniki okazały się przydatne czy też nieprzydatne do analizy mitochondrialnego importu sprawiłyby, że cykl zaprezentowanych prac byłby bardziej spójny, zarówno pod kątem obiektu badań jak i zastosowanej metodologii. Czy powszechnym jest stosowanie metod proteomicznych opartych na spektrometrii mas do analiz strukturalnych i funkcjonalnych mitochondriów i procesów transportu przez błony mitochondrialne? Jakie wady i zalety prezentują te techniki w kontekście badań śluzowców i ich mitochondriów? Jakie inne techniki wykorzystuje się w tego typu analizach? Prosiłabym o przedyskutowanie tej kwestii podczas obrony.

Podsumowując, wymienione uwagi w żadnej mierze nie umniejszają wysokiej wartości pracy. Nie mam w zwyczaju również wymieniać błędów stylistycznych czy edytorskich, gdyż nie wpływają one na moją ocenę merytoryczną dysertacji. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu prowadzonych przez siebie prac, a postawiwszy przed sobą ambitne cele badawcze dokonała ich

realizacji. Praca doktorska mgr Mazur stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie wczesnych struktur wielokomórkowych związanych ze stresem głodu w komórkach śluzowca *D. discoideum*. Doktorantka pokazała, że w trakcie tych procesów może dochodzić do zmian w oddziaływaniu kompleksu TOB/SAM z innymi białkami mitochondrialnymi, przy niezmienionej organizacji kompleksu samego TOB/SAM i jego podjednostek. W jego trakcie dochodzi jednak do zaburzenia akumulacji białek biorących udział w glukoneogenezie oraz odpowiedzialnych za prawidłową funkcję mitochondriów. Może to stanowić ważny element odpowiedzi komórek śluzowca na brak pożywienia w postaci metabolicznego przeprogramowania komórek na wykorzystanie alternatywnego źródła węgla. **Recenzowana praca ma formę trzech artykułów naukowych z tzw. listy filadelfijskiej, ponadto mgr Mazur jest współautorką trzech innych prac opublikowanych w renomowanych czasopismach.** Z pełnym, przekonaniem i w świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy oryginalności i nowości naukowej, spełnia zwyczajowe oraz ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim sformułowane w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Moniki Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wartość naukową prezentowanych wyników, potwierdzoną publikacjami, wnoszę o rozważenie wyróżnienia recenzowanej dysertacji.



dr hab. Magdalena Łuczak

DOCUMENT
CREATED
WITH



PDF
COMBINER

PDF Combiner is a free application that you can use to combine multiple PDF documents into one.

Three simple steps are needed to merge several PDF documents. First, we must add files to the program. This can be done using the Add files button or by dragging files to the list via the Drag and Drop mechanism. Then you need to adjust the order of files if list order is not suitable. The last step is joining files. To do this, click button Combine PDFs.

Main features:

secure PDF merging - everything is done on your computer and documents are not sent anywhere

simplicity - you need to follow three steps to merge documents

possibility to rearrange document - change the order of merged documents and page selection

reliability - application is not modifying a content of merged documents.

Visit the homepage to download the application:

www.jankowskimichal.pl/pdf-combiner

To remove this page from your document, please donate a project.