

UNIWERSYTET
O P O L S K I

Prof.dr hab. inż. Tadeusz Janas
ZESPÓŁ BADAŃ EGZOSOMÓW I
LIPOSOMÓW
INSTYTUT BIOLOGII
ul. Kominka 6, 6a; 45-032 Opole
tel. +48 77 401 60 50
fax. +48 77 401 60 51
tadeusz.janas@uni.opole.pl

15.05.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Jolanty Żelasko
„Badanie oddziaływania kwasu fosfatydowego z białkiem mTOR oraz wpływ cholesterolu na
tę interakcję”

wykonana pod kierunkiem dr hab. Aleksandra Czogalli, prof. UW
na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
i przedstawiona Radzie Wydziału Biotechnologii na tym Uniwersytecie.

Badania oddziaływań lipidów z makrocząsteczkami takimi jak białka czy kwasy nukleinowe stanowią ważny wkład do zrozumienia procesów komórkowych. Przykładem takich badań jest rozprawa doktorska mgr Jolanty Żelasko, która skoncentrowała się na oddziaływaniach kwasu fosfatydowego z białkiem mTOR oraz wpływ cholesterolu na tę interakcję. Białko mTOR należy do jednych z ważniejszych białek w komórce, jest zaangażowane m. inn. w kontrolę jej wzrostu, a kwas fosfatydowy reguluje aktywność kinazy mTOR poprzez wiązanie się z domeną FRB tego białka. Jednak dokładny mechanizm i specyficzność tego wiązania pozostają słabo poznane.

Celem badań było:

- a) określenie wpływu struktury łańcuchów acylowych badanych cząsteczek kwasu fosfatydowego na oddziaływanie z domeną FRB białka mTOR. Sprawdzenie, jaki wpływ na specyficzność interakcji ma długość łańcuchów kwasów tłuszczowych i liczba występujących w nich wiązań podwójnych,
- b) określenie znaczenia cholesterolu w regulacji oddziaływania między badanymi PA a domeną FRB białka mTOR,
- c) porównania mobilności domeny FRB oddziałującej z dwuwarstwami lipidowymi bogatymi w kwas fosfatydowy oraz analiza kinetyczna oddziaływania na poziomie molekularnym w czasie rzeczywistym badanych cząsteczek kwasu fosfatydowego z domeną FRB.

Rozprawa jest napisana w języku polskim, zawiera 98 stron, w tym: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis ilustracji i tabel, wstęp, założenia i cel badań, materiały i metody badawcze, opis wyników badań, dyskusję, wnioski, spis literatury zawierający 228 pozycji oraz spis publikacji i doniesień konferencyjnych.

Doktorantka w części „Wstęp” opisuje: błony biologiczne i ich oddziaływanie z białkami, strukturę i funkcje białka mTOR, ścieżki syntezy kwasu fosfatydowego, wpływ właściwości fizykochemiczne kwasu fosfatydowego na jego oddziaływanie z białkami, znaczenie wiązania się kwasu fosfatydowego do domeny FRB tego białka oraz wpływ cholesterolu na organizację błon. Chociaż doktorantka pisze, że aktywacja mTORC1 jest uzależniona od rekrutacji kompleksu do błony lizosomów, a błona komórkowa, zewnętrzna błona mitochondrium i pęcherzyki endosomalne łączone są z procesem aktywacji mTORC2, brakuje pogłębionej analizy prac związanych z lokalizacją membranową białka mTOR. Jest to ważne zagadnienie, gdyż badania oddziaływań lipidu z domeną FRB białka Doktorantka prowadzi m. inn. przy użyciu pęcherzyków lipidowych. Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższym rozdziałem:

- jakie są dowody doświadczalne wskazujące na lokalizację białka mTOR na różnych błonach komórkowych?
- jaki jest charakter oddziaływań białka mTOR z tymi błonami? Czy białko to posiada domeny, które wnikają do warstwy hydrofilowej lub hydrofobowej błon?

W części: “Materiały i Metody” Doktorantka przedstawia materiały, których używała w swoich badaniach. Następnie opisuje metody, które stosowała, czyli nadekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych FRB, FRB-GFP i GFP, analiza struktury domeny FRB metodą dichroizmu kołowego, metoda FAT BLOT do szacowania wiązania wybranych lipidów z domeną FRB, przygotowanie i charakterystyka dużych jednowarstwowych pęcherzyków lipidowych. Analizę oddziaływania kwasu fosfatydowego (PA) z domeną FRB Doktorantka przeprowadziła metodami: flotacji liposomów w gradiencie gęstości sacharozy, mikroskopii fluorescencyjnej (gdzie sondę fluorescencyjną Rh-PE użyto jako marker olbrzymich pęcherzyków lipidowych w kanale czerwonym, a domenę FRB w fuzji z GFP w kanale zielonym), odzysku fluorescencji po fotowysłonięciu (FRAP) oraz interferometrii biowarstwowej (BLI). Wg Recenzenta, technika BLI nie została opisana dostatecznie szczegółowo, dlatego Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższym rozdziałem:

- dlaczego pomiary BLI mogą pokazywać oddziaływania lipid-białko?
- jak oblicza się stałe kinetyczne z tych pomiarów?

W części pracy pt. "Wyniki" Doktorantka przedstawia swoje oryginalne badania dotyczące:

- klonowania sekwencji kodującej domenę FRB, mutagenезy i selekcji pozytywnych klonów, optymalizacji warunków nadekspresji i oczyszczania białek rekombinowanych FRB i FRB-GFP oraz analizy struktury domeny FRB metodą dichroizmu kołowego
- wiązania wybranych lipidów z domeną FRB metodą FAT BLOT
- przygotowania i charakterystyki dużych jednowarstwowych pęcherzyków poprzez pomiar wartości potencjału Zeta oraz pomiar rozkładu wielkości liposomów
- wpływu stopnia nasycenia i długości łańcuchów acylowych kwasu fosfatydowego (PA) na interakcje FRB-PA stosując test flotacji oraz mikroskopię konfokalną
- wpływu cholesterolu na wiązanie FRB-PA stosując test flotacji oraz mikroskopię konfokalną
- specyficzności wiązania FRB względem PA stosując test flotacji oraz mikroskopię konfokalną
- podobieństw pomiędzy oddziaływaniem FRB z PA o różnej strukturze a zachowaniem się FRB na powierzchni błon badanej techniką FRAP
- analizy kinetyki wiązania badanych układów metodą BLI.

Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższym rozdziałem:

- metoda FAT BLOT polega na unieruchomieniu wybranych lipidów na podłożu nitrocelulozowym, a następnie inkubacji membrany w obecności białka. Czy lipid wiąże się częścią hydrofobową (wówczas białko oddziałuje z częścią hydrofilową lipidu) czy też lipid wiąże się częścią hydrofilową (wówczas białko oddziałuje z częścią hydrofobową lipidu)?
- w metodzie FRAP w kanale fluorescencyjnym odpowiadającym emisji fluorescencji GFP, gdy badana domena FRB (w fuzji z GFP) oddziałuje z lipidem błonowym, szybkość odzysku fluorescencji jest wolniejsza w stosunku do tego, co byłoby obserwowane, gdyby lipid błonowy nie wiązał się z białkiem. Czy szybkość odzysku fluorescencji w badanym układzie wynika z dyfuzji lateralnej lipidów do wypalonego obszaru błony czy też z dalszego (niezależnego od dyfuzji lateralnej lipidów) wiązania się domen FRB (obecnych w roztworze wodnym) do lipidów pęcherzyka lipidowego w wypalonym obszarze błony?

W oparciu o uzyskane wyniki badań autorka sformułowała następujące Wnioski:

- domena FRB wiąże się do błon bogatych w PA
- budowa PA, nasycenie łańcuchów acylowych i ich długość moduluje zdolność oddziaływania z domeną FRB
- obecność cholesterolu zmienia charakter wiązania FRB z PA w sposób zależny od budowy molekularnej PA.

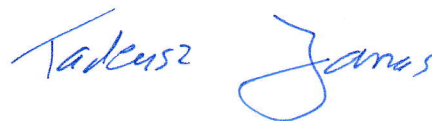
Recenzent ma następujące pytania w związku w powyższym rozdziałem:

- jaki jest wniosek z analizy podobieństw pomiędzy oddziaływaniem FRB z PA o różnej strukturze a zachowaniem się FRB na powierzchni błon badanej techniką FRAP?
- czy zwiększenie nasycenia łańcuchów acylowych i ich długości zwiększa czy też zmniejsza zdolność oddziaływania PA z domeną FRB?
- z czego może wynikać wpływ cholesterolu na wiązanie się domeny FRB z PA?

Doktorantka jest współautorem czterech artykułów w czasopismach naukowych (w tym trzech artykułów znajdujących się na tzw. „Liście Filadelfijskiej”) oraz siedmiu komunikatów konferencyjnych. Odbyła również kilka staży i praktyk naukowych w laboratoriach mikrobiologicznych oraz w ramach programu „Erasmus”.

Oceniam wysoko rozprawę doktorską mgr Jolanty Żelasko. Doktorantka przeprowadziła wiele pracochłonnych analiz przy użyciu zaawansowanych technik eksperymentalnych, dokonała analizy wyników, i w efekcie otrzymała wartościowe dane wskazujące na to, że struktura części hydrofobowej kwasu fosfatydowego jest istotna dla oddziaływania tego lipidu z białkiem mTOR. Praca jest starannie opracowana od względem edytorskim, jednakże Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych błędów, tzw. literówek i kilku niezbyt poprawnych stylistycznie sformułowań. Nie sądzę, aby było wskazane wymienianie ich w tym miejscu, bowiem nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr Jolantę Żelasko rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Jolanty Żelasko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Tadeusz Janas