



Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Jolanty Żelasko

z tytułu

**Badanie oddziaływania kwasu fosfatydowego z białkiem mTOR oraz
wpływ cholesterolu na tę interakcję**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Jolanty Żelasko została zrealizowana pod opieką dr hab. Aleksandra Czogalli, prof. UW r w Zakładzie Cytobiochemii na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Rozprawa ma formę pracy pisemnej liczącej 98 strony. Jest opatrzona streszczeniem w języku angielskim, co spełnia wymogi ustawy.

Celem badań realizowanych w trakcie doktoratu było ustalenie czy długość łańcucha acylogowego kwasu fosfatydowego (PA) i stopień jego nasycenia wpływają na specyficzność wiązania PA przez mTOR. Główną hipotezą badawczą przyjętą w pracy było to, że struktura chemiczna łańcuchów acylogowych moduluje ekspozycję lipidów sygnałowych na powierzchni błony, a co za tym idzie, pośrednio wpływa na interakcję z białkami. Struktura łańcuchów acylogowych lipidów bezpośrednio wpływa na kluczowe dla wiązania białek parametry dwuwarstwy takie jak płynność, elastyczność, grubość i lokalna krzywizna błony i stopień uporządkowania. Dlatego w pracy badawczej wybrano trzy różne kwasy fosfatydowe, różniące się długością i stopniem nienasycenia łańcuchów węglowodorowych. Ponadto Doktorantka zbadała wpływ obecności cholesterolu w membranie lipidowej na oddziaływanie PA z domeną FRB białka mTOR.

Ocena umiejętności przygotowania opracowania naukowego

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ, na który składa się siedem głównych rozdziałów. Pracę rozpoczyna wykaz skrótów stosowanych w treści rozprawy, jest on niezwykle pomocny, gdyż praca zawiera bardzo dużo skrótów. Rozdział zatytułowany „Wstęp” prezentuje aktualny stan wiedzy dotyczącej zagadnień poruszanych w pracy doktorskiej. Następnie Autorka przedstawiła założenia i cel pracy. Kolejny rozdział zatytułowany „Materiały i Metody” zawiera opisy stosowanych materiałów i aparatury, procedur preparatyki próbek oraz

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



sposobu przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów. W rozdziale tym Doktorantka zawarła również opis stosowanych metod badawczych. Najważniejszy rozdział pracy zatytułowany „Wyniki” składa się z 11 podrozdziałów stanowiących logiczną całość. W dwóch ostatnich rozdziałach Autorka zawarła dyskusję wyników oraz podsumowanie wniosków swoich badań.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem. Zawiera liczne starannie przygotowane schematy, wykresy, tabele oraz zdjęcia mikroskopowe. Układ rozprawy wydaje się uzasadniony i pomaga w śledzeniu treści. Podczas redagowania tak obszernego opracowania Autorka nie ustrzegła się drobnych nieścisłości w opisie i prezentacji swoich wyników. Kilka przykładów przedstawiono poniżej.

W pracy Autorka wyznaczała stosując metodę BLI podstawowe parametry kinetyki wiązania, takie jak stała szybkości asocjacji (K_a), stała szybkości dysocjacji (K_d) i równowagowa stała wiązania (K_D). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 6. Jednak sposób obliczeń tych parametrów nie został opisany w pracy. Ponadto, Doktorantka była niekonsekwentna w nazywaniu tych parametrów nazywając je w niektórych miejscach jako stałe asocjacji (K_a) oraz stałe dysocjacji (K_d), co jest mylące. Opis eksperymentów FRAP nie jest kompletny. FRAP jako skrót od Fluorescence recovery after photobleaching wskazuje, że eksperyment zaczyna się od fotowysbielania, niestety ten etap nie został opisany w pracy.

W rozdziale pt. „Wnioski” ostatnie zdanie (pkt. 4) „Określono kinetykę wiązania dla PA o różnej strukturze w obecności bądź nieobecności CH i uzyskano parametry K_a , K_d , K_D ” nie jest wnioskiem, a opisem tego co zostało wykonane. Na stronie 46, Autorka napisała: „Próbkę przygotowano na 50 μ l...”, czy Autorka chciała napisać, że próbka miała taką objętość? Strona 51, „chloroform/metanol/acetone/HCl (1N) – 2/1/0,5/0,1 v/v, stosowanie stężenia normalnego nie jest zalecane przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej.

Te nieścisłości uchwycone w pracy nie stwarzają kłopotu podczas czytania rozprawy, a tym bardziej nie wpływają na wartość naukową całej pracy.

Ocena ogólnej wiedzy doktorantki w dziedzinie naukowej związanej z tematem rozprawy doktorskiej

Praca doktorska p. Żelasko zawiera obszerny rozdział zatytułowany Wstęp, który został opracowany w oparciu o bogatą literaturę przedmiotu (Autorka



zacytowała w nim aż 184 oryginalnych prac badawczych). W tej części pracy Autorka przedstawiła w pięciu podrozdziałach wprowadzenie w tematykę rozprawy. Doktorantka opisała m.in. czym są błony komórkowe oraz rodzaje i charakter oddziaływań białkowo-lipidowych. Bardzo szczegółowo przedstawiono strukturę i funkcje białka mTOR (mTOR – ang. mammalian lub mechanistic target of rapamycine) oraz budowę kompleksów tego białka. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisała budowę domeny FRB (domena wiążąca FKBP12-Rapamycynę), przez którą cząsteczki PA wiążą się z białkiem mTOR. Następnie opisano występowanie i znaczenie kwasu fosfatydowego, który jest regulatorem aktywności kinazy mTOR poprzez wiązanie się z domeną FRB. Doktorantka opisała ścieżki syntezy PA oraz właściwości fizykochemiczne, w szczególności równowagi kwasowo-zasadowe. Dużo uwagi poświęcono na omówienie oddziaływania kwasów fosfatydowych z domeną FRB. Ostatni podrozdział tej części pracy poświęcony został zaprezentowaniu wpływu obecności cholesterolu na organizację molekularną błon lipidowych.

Badania innych naukowców opisane w tym rozdziale są dobrze dobrane i pozwalają czytelnikowi z zapoznaniem się z tematyką, co świadczy o tym, że Autorka szczegółowo zapoznała się z dostępną literaturą w temacie swojej pracy doktorskiej. Po zapoznaniu się z tą częścią pracy pani mgr inż. Jolanty Żelasko oraz po przeanalizowaniu przeprowadzonych przez Nią badań mogę z całkowitym przekonaniem stwierdzić, że posiada ona ugruntowaną wiedzę w dziedzinie nauki, której dotyczy praca doktorska.

Ocena nowatorskości badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Zakres prac badawczych podjętych przez panią mgr inż. Jolantę Żelasko w trakcie realizacji doktoratu były dosyć szeroki i rozciągał się od przygotowania i oczyszczenia domen FRB, badania wpływu struktury łańcuchów acylowych PA oraz obecności cholesterolu na oddziaływanie PA z domeną FRB białka mTOR, do określenia kinetyki tych oddziaływań. W mojej ocenie szczególnymi osiągnięciami pracy doktorskiej pani mgr inż. Jolanty Żelasko są:

- zoptymalizowanie procedury otrzymywania pełni funkcjonalnej i poprawnie sfałdowanej domeny FRB białka mTOR w oparciu o komórki bakteryjne E. coli i oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa. Doktorantka sprawdziła różne warunki ekspresji białek w bakteriach oraz oczyszczania, co wymagało dużych nakładów pracy.

- określenie wpływu struktury łańcuchów acylowych badanych PA na oddziaływanie z domeną FRB białka mTOR. Wykazano dużą specyficzność procesu wiązania się domeny FRB do PA w zależności od długości łańcuchów



acylowych oraz stopnia ich nienasylenia. W tych badaniach Doktorantka użyła trzech PA: 1-palmitoilo-2-oleilo-*sn*-glicero-3-fosforan (POPA), 1,2-palmitoilo-*sn*-glicero-3-fosforan (DPPA) oraz 1-stearoilo-2-arachidonylo-*sn*-glicero-3-fosforanu (SAPA). Uzyskane wyniki pokazały, że długość i stopień nasycenia łańcuchów acylowych PA może zmieniać jego dostępność na powierzchni błony, a tym samym ułatwiać, bądź utrudniać oddziaływanie z białkami. Bardzo ciekawym wynikiem potwierdzającym specyficzność oddziaływań z DPPA, jest pokazanie lateralnej segregacji białka na powierzchni pęcherzyków zawierających nasycony PA, w przeciwieństwie do równomiernego rozkładu białka na powierzchni liposomów z nienasyconym PA. DPPA poniżej temperatury przejścia fazowego tworzy w membranach lipidowej domeny, do których może przyłączać się białko.

- określenie wpływu obecności cholesterolu w membranie na oddziaływanie między badanymi PA a domeną FRB białka mTOR. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazują, że cholesterol może spełniać rolę modulatora wiązania PA-domena FRB, nie jest natomiast cząsteczką biorącą udział w oddziaływaniu z białkiem. Autorka pokazała, że dla lipidów nienasyconych (POPA i SAPA) obecność cholesterolu zwiększyła frakcję związanego białka, a dla nasyconego DPPA procent związanego białka spadł. Cholesterol jest cząsteczką, która wpływa na płynność membrany lipidowej. Wprowadzenie cholesterolu do membrany fosfolipidowej w fazie żelowej zmniejsza jej uporządkowanie i analogicznie zwiększa uporządkowanie faz ciekłokrystalicznych, co przekłada się na dostępność grup polarnych PA do wiązania z domeną FRB.

Podsumowując, pani mgr Żelasko zgromadziła bardzo interesujący materiał badawczy. Należy podkreślić, że duża część wyników otrzymanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej została już opublikowana w publikacji Żelasko, J.; Czogalla, A. Selectivity of mTOR-Phosphatidic Acid Interactions Is Driven by Acyl Chain Structure and Cholesterol. *Cells* 2022, 11, 119 (<https://doi.org/10.3390/cells11010119>). W swoich badaniach Doktorantka stosowała wiele zaawansowanych technik eksperymentalnych, m.in. analiza Fat Bot, mikroskopia konfokalna z ilościową analizą obrazu i pomiarami FRAP oraz pomiary interferometrii biowarstwowej (ang. Bio-layer interferometry, BLI), umożliwiające obserwacje oddziaływań pomiędzy białkami w czasie rzeczywistym. Opisy przeprowadzonych eksperymentów są wystarczające, aby można je było powtórzyć przez innych naukowców. Uważam, że sposób przeprowadzenia doświadczeń i opracowania ich wyników zasługują na

uznanie. Drobną sugestią do dalszych badań oddziaływań ligand-białko, jako dodatkową metodę, Doktoranta może użyć izotermiczną mikrokalorymetrię titracyjną (ang. Isothermal titration calorimetry, ITC), która pozwala uzyskać informację o parametrach termodynamicznych takich oddziaływań.



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wnioski końcowe

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy oceny, osiągnięte wyniki oraz sposób ich prezentacji i interpretacji stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Jolanty Żelasko pt. „Badanie oddziaływania kwasu fosfatydowego z białkiem mTOR oraz wpływ cholesterolu na tę interakcję” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani Jolanty Żelasko do publicznej obrony.

Wydział Chemii

Kraków, 26 maja 2023

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl