



INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Warszawa, 26 luty 2021 r.

Dr hab. Róża Kucharczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Laboratory of Bioenergetics and Mechanisms of Mitochondrial Diseases

Ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr Macieja Rafała Wakuły**

p.t. „**Wpływ ludzkiego białka HAX1 na morfologię i funkcjonowanie mitochondriów w komórkach nowotworowych**”

wykonanej w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie pod kierunkiem dr hab. Ewy Grzybowskiej.

Celem pracy doktorskiej mgr Macieja Wakuły było zdefiniowanie funkcji białka HAX1 w komórkach ludzkich. Mutacje w genie kodującym to białko zidentyfikowano u pacjentów cierpiących na wrodzoną neutropenię Kostmanna, oraz z zaburzeniami neurologicznymi. Ponadto w wielu typach nowotworów poziom białka HAX jest podwyższony. Białku HAX1 przypisuje się lokalizację mitochondrialną ale także cytoplazmatyczną czy jądrową oraz udział w apoptozie i migracji komórek. Literatura na jego temat nie jest jednak spójna dlatego Doktorant podjął się zbadania lokalizacji białka HAX1 a także wykorzystując techniki wielkoskalowe identyfikacji procesów komórkowych, w które jest ono zaangażowane. Biorąc pod uwagę jednoznaczne jednak doniesienia na temat znaczenia tego białka w procesach chorobowych podjęte zagadnienie jest bardzo ważne, a wyniki jego rozprawy są istotne, gdyż wiedza ta w przyszłości może przysłużyć się do opracowania terapii chorób związanych z dysfunkcją HAX1.

Formalny opis rozprawy:

Rozprawa doktorska mgra Macieja Wakuły została napisana w języku polskim i składa się z czterech głównych rozdziałów: wstępu, opisu materiałów i metod, wyników i dyskusji wyników. Ponadto zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, jasno ujęte cele pracy, wnioski z pracy, spis treści, stosowanych skrótów, literatury odwołującej

czytelnika do 224 artykułów oraz suplementu zawierającego trzy tabele i czternaście dodatkowych rycin.

Streszczenie podsumowuje prace bardzo dobrze, jest spójne z celami pracy. Wstęp (34 strony, 3 ryciny) wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy: w wybrane aspekty funkcji mitochondriów w szczególności w patologii chorób oraz przedstawia obecny stan wiedzy na temat roli białka HAX1. Wstęp zawiera krótkie posumowanie przedstawionych informacji koncentrując czytelnika na kwestiach najistotniejszych.

W rozdziale Materiały i Metody (obejmującym 33 strony) Doktorant opisuje stosowane metody, opatrzył je jednych schematem ułatwiającym zrozumienie podejścia, zbiera użyte i wytworzone przez siebie materiały oraz schematy eksperymentów np. immunoprecypitacji w 11 tabel.

Rozdział Wyniki (obejmujący 69 stron, 41 rycin i 15 tabel) Doktorant rozpoczął schematem go podsumowującym. Pierwsza część wyników zapoznaje z modelami badawczymi i opisuje konstrukcję oraz weryfikację linii pozbawionych białka HAX1.

W drugiej części wyników Autor opisał eksperymenty, które pozwoliły jednoznacznie umiejscowić białko HAX1 w mitochondriach i zidentyfikować N-terminalny fragment sekwencji kierującej je do mitochondriów.

W trzeciej części wyników Autor przedstawia badania doprowadzające do identyfikacji potencjalnych partnerów białkowych białka HAX1. Potwierdził oddziaływanie z dwoma białkami zidentyfikowanymi w eksperymencie pull-down-MS in vivo metodą FRET oraz metodą koimmunoprecypitacji z HAX1, zawężając oddziaływanie do fragmentów/domen białek CLPB i SLC25A13. Kierując się zidentyfikowanymi oddziaływaniami Doktorant pokazał, że białko HAX1 jest niezbędne do utrzymania prawidłowej homeostazy białek w komórce oraz homeostazy redoks w mitochondriach. Dodatkowo dostarczył argumentów wskazujących na rolę HAX1 w transporcie asparaginanu wykazując jego oddziaływanie z transporterami SLC25A12 i SLC25A11 tego szlaku.

W czwartej części eksperymentalnej rozprawy Autor dokonał analizy danych transkryptomicznych z bazy danych TCGA, koncentrując się na danych z komórek raków szyjki macicy i białaczki szpikowej, i wytypował geny których ekspresja jest skorelowana z ekspresją *HAX1*. Niezależnie zbadał zmiany w profilu ekspresji genów w linii HAX1 KO za pomocą sekwencjonowania następnej generacji. Wśród genów o podwyższonej ekspresji zidentyfikował gen *ASS1*, który koduje syntetazę arginino-bursztynianową. Enzym ten włącza do cyklu mocznikowego asparaginan wyeksportowany z macierzy mitochondrialnej do cytoplazmy przez białka SLC25A12/13. Natomiast geny kodujące podjednostki

mitochondrialnego rybosomu czy łańcucha oddechowego znalazły się w grupie genów o obniżonej ekspresji. Oba podejścia wskazują na rolę HAX1 w przebiegu translacji w mitochondriach oraz aktywności OXPHOS.

Dlatego w piątej części wyników Doktorant zanalizował oddychanie komórkowe, ultrastrukturę mitochondriów i poziom translacji w mitochondriach w liniach HAX1 KO. Znaczących zmian nie znalazł ale zaobserwował opóźnienie zahamowania aktywności kompleksu I po zastosowaniu rotenonu - inhibitora tego kompleksu. Odkrył natomiast, że istotnie białko ASS1 akumuluje się bardzo w lichii HL60 HAX1 KO ale nie w linii Hela, potwierdzając tym samym wyniki eksperymentu NGS i znaczenie HAX1 w aktywności cyklu mocznikowego.

Dyskusja (obejmująca 18 stron i 1 rycinę), zakończona podsumowaniem, odnosi się do głównych odkryć Doktoranta i umieszcza je w wśród opublikowanych danych na temat białka HAX1. Dodatkowo Doktorant wzbogacił dyskusję w rozważania teoretyczne funkcji potencjalnego kompleksu HAX1 z CLPB i SLC25A13.

Najważniejsze osiągnięcia pracy badawczej Doktoranta to:

- zawężenie lokalizacji białka HAX1 do mitochondriów i wykluczenie obecności HAX1 w innych przedziałach komórkowych;
- identyfikacja kolejnych, dotąd nie opublikowanych partnerów białkowych CLPB, SLC25A13, SLC25A12 i SLC25A11, w szczególności wskazanie fragmentu HAX1 istotnego w tym oddziaływaniu;
- odkrycie znaczenia białka HAX1 w homeostazie białek i regulacji szlaku wahadła jabłczanowo-asparaginowego. To ostatnie odkrycie tym ważniejsze, że wiąże ze sobą obserwacje podwyższonego poziomu HAX1 z obniżeniem akumulacji ASS1 w komórkach nowotworowych, wskazując być może na mechanizm w jaki przyczyniają się one do przebiegu procesu nowotworowego.

Po wnikliwym zapoznaniu się z wynikami eksperymentów zgadzam się z wnioskami przedstawionymi przez Doktoranta w rozdziale Wnioski.

Mam kilka uwag i pytań do Doktoranta:

- 1) Wspomniał Pan we wstępie, że istnieją cztery różne warianty transkryptu HAX1. Ułatwiłoby zrozumienie miejsc i opisu skutków mutacji w HAX1 związanych z chorobami, gdyby przedstawił to pan na schemacie, zwłaszcza, że się pan do wariantu II-giego odnosi. Utrudnienie w zrozumieniu miałam także dlatego, że o mówiąc o mutacjach zastosował pan

symbolikę substytucji reszt aminokwasowych w białku. Pisze też pan o „grupach mutacji” podając jedną substytucję w białku – oczywiście mutacje w DNA mogą być różne skutkując taką samą substytucją reszty aminokwasowej w białku. Proszę o uzupełnienie tych informacji, gdyż paragraf 1.3.1 z tego powodu nie jest jasny. Również widząc ryc. 4.2.2.1 nasuwa się pytanie czy to sekwencja kompletna białka a jak się mają warianty? W dyskusji pan wspomniał, że warianty białka nigdy nie zostały zidentyfikowane/opisane. Warto było o tym uświadomić czytelnika przy tej okazji. Czy w opisie przypadków pacjentów są informacje o funkcjonowaniu mitochondriów w komórkach z patogennymi wariantami HAX1? To z pewnością warto zbadać na modelu komórkowym.

2) Czy są prace na temat znaczenia czy związku funkcji mitochondrialnych w migracji komórek, w szczególności tych funkcji wymagających białka HAX1?

3) Co pan uważa na temat wyłącznej lokalizacji mitochondrialnej białka HAX1, która w pana modelu badawczym ma miejsce? Zważywszy, że trzeci naturalnie występujący wariant transkryptu HAX1 pozbawiony jest pierwszych 26 kodonów (koduje zatem HAX1 Δ 1-26AA). To wyraźnie sugeruje populację HAX1 pozamitochondrialną (zabrakło odniesienia do referencji przy tej informacji).

4) Komentarz do białek obecnych w precypitacie na złożu związanym z anty-HAX1: współoczyściły się dwie podjednostki kompleksu oksydazy cytochromowej MT-CO2 oraz COX4I1, które zakładając lokalizację HAX1 w IMS mają szansę z nim oddziaływać, bo mają fragmenty wyeksponowane do IMS. A jednocześnie zidentyfikowano też podjednostkę b syntazy ATP i ósmą kompleksu b-c1, które są zakotwiczone w błonie wewnętrznej albo całkowicie albo wyeksponowane do macierzy. Więc albo to oddziaływanie nie jest prawdziwe albo HAX1 znajduje się też w macierzy mitochondrialnej. Myślał pan by to zbadać? Mając w ręku specyficzne przeciwciała eksperyment frakcjonowania mitochondriów i traktowania frakcji proteinazą K dałby odpowiedź. Drożdżowy szczep Bi-Genomic-Split GFP również warto by tu wykorzystać. Również w tym eksperymencie dominują dwie podjednostki tubuliny. Zważywszy, że rotenon hamuje składanie tubulin a jednocześnie opóźnia inhibicję kompleksu I w liniach HAX1 KO to oddziaływanie może być prawdziwe?

5) W analizie stanu redox mitochondriów (paragraf 3.2.7.4 oraz Ryc. 4.3.6.2 i 4.3.6.3 ile komórek przeanalizowano?

6) Ryc. 4.3.2.5 – dlaczego białko SLC25A13 użył pan w fuzji N-terminalnej a nie C-terminalnej, w przeciwieństwie do CLPB?

7) Tabela 4.3.3.2 i ryc. 4.3.3.4 (powinno być 4.3.3.3) – co spowodowało użycie C-terminalnej fuzji HAX1-EGFP a nie HAX1-myc (jak na figurze 4.3.2.2) do precypitacji z CLPB-FLAG, zwłaszcza, że takie białko lokalizowało się również w cytoplazmie?

8) Warto by było policzyć akumulację białek na rycinach 4.3.4.1 i 4.5.3.1 oraz podać w którym momencie pomiaru jakie substraty oddechowe czy inhibitory były dodawane na ryc. 4.5.1.1A, 4.5.1.2A oraz 4.5.1.3A.

9) Czy próbował pan stworzyć linie z nadekspresją białka HAX1, czyli zasymulować sytuację opisaną w niektórych guzach, by zbadać badane procesy w takiej linii?

W rozprawie Autor nie ustrzegł się skrótów myślowych czy nieścisłości, nielicznych jednak literówek i błędów edytorskich/językowych, np. używanie nazwy aminokwasu zamiast reszty aminokwasu czy pomyłki w numeracji Rycin czy ich cytacji w tekście. Nie obniżają one wartości naukowej rozprawy niemniej z obowiązku niektóre wymienię:

1) Skrót myślowy „grupa genów kodujących mitochondrialny rybosom” – paragraf 4.4.2, zapewne miał pan na myśli podjednostki rybosomu; czy „homozygoty posiadające mutację R86X”. Inny przykład niezgrabności językowej: „U ludzi niezdolnych do syntezy tego białka.... Czy nie produkujących HAX1”.

2) Fragment zdania w streszczeniu „poziom HAX1 wpływa ilość transkryptów” nie jest zgodny z prawdą, bo eksperyment przeprowadzony był w liniach z brakiem białka HAX1 a nie regulowaną ekspresją czy nadekspresją białka HAX1.

3) Choć wiele enzymów syntetyzujących związki istotnie nazywa się po polsku syntetazami, to jednak w kontekście mitochondrialnej syntazy ATP nie używa się tego określenia.

4) Zgrabniej po polsku brzmi przedział komórkowy niż kompartment.

5) Łatwiej zrozumieć: przestrzeń międzybłonowa mitochondriów niż „cytoplazmatyczna strona IMM”. Fragment: „mitochondria odgrywają bardzo znaczącą rolę” – bardzo jest tu niepotrzebne.

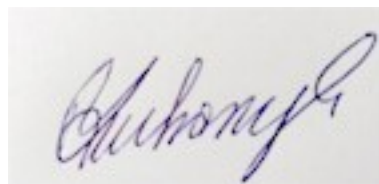
6) Brak niektórych, używanych skrótów na liście, np.: CJ, IBM, TET, IHDM, GCSF, UPRAM, ER-SURF.

7) Termin „stężenie” odnosi się raczej do związków niż do komórek – paragraf 3.2.2.1 i 3.2.2.5.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska przedstawia nowe odkrycia badawcze. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały

przez Doktoranta właściwie uzasadnione. Część wyników otrzymanych przez Doktoranta zostało opublikowanych w dwóch artykułach, w których Doktorant jest pierwszym autorem, ale jego dorobek naukowy jest szerszy co wskazuje na zaangażowanie w projekty całego zespołu. Przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczące rozprawy mgr Macieja Rafała Wakuły w większości mają charakter drugorzędny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Macieja Rafała Wakuły w pełni spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii o dopuszczenie pana mgr Macieja Rafała Wakuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Róża Kucharczyk

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Róża Kucharczyk'.