



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

Łódź, dnia 12 listopada 2012 r.

Ocena

pracy doktorskiej mgr Mariusza Walusia pt.: „Znaczenie mutacji genu trójpeptydylopeptydazy I dla syntezy, dojrzewania i funkcjonalności jego produktu”.

Przyczyną powstawania lizosomalnych chorób spichrzeniowych jest defekt genetyczny skutkujący brakiem lub niedoborem aktywności jednego z białek wchodzących w skład czterech grup funkcjonalnych, tj. hydrolaz lizosomalnych działających w pH ~ 5.0 zaangażowanych w rozkład różnych związków organicznych; białek uczestniczących w transporcie substancji przez błony lizosomalne; białek niezbędnych do kierowania enzymów do lizosomów lub aktywatorów enzymów lizosomalnych. Zaburzenia w funkcjonowaniu lizosomalnych enzymów hydrolitycznych, tj. brak lub niedobór aktywności konkretnej hydrolazy prowadzi do ciągłej akumulacji w lizosomach niezdegradowanych lub niekompletnie zdegradowanych makrocząsteczek będących substratami dla danego enzymu, co wpływa na nieprawidłowe funkcjonowanie komórek, tkanek i narządów. Do nadmiernego spichrzenia lizosomalnego prowadzą defekty transporterów, które odgrywają rolę w przenoszeniu przez błonę lizosomalną do cytosolu monosacharydów lub aminokwasów powstających podczas

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, tel. 042-635-44-89, fax 042-635-44-84
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl, e-mail: kcytobio@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
tel. 042-635-44-87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

hydrolizy makrocząsteczek. Defekty białek siateczki śródplazmatycznej (ER), aparatu Golgiego (AG) zaangażowanych w kierowanie enzymów do lizosomów powodują, że dany enzym nie dociera do swojego miejsca działania. Zrozumienie patomechanizmu lizosomalnych chorób spichrzeniowych stało się możliwe dzięki badaniom z zakresu biochemii, genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii, co niewątpliwie odgrywa rolę w postępie diagnostyki jak też rozwoju nowoczesnych metod terapeutycznych.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Mariusza Walusia znakomicie włącza się w nurt badań nad mechanizmami powstawania lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Podjęta w pracy problematyka badawcza jest bardzo istotna zarówno z poznawczego, ale przede wszystkim medycznego punktu widzenia. Dotyczy ona trójpeptydylopeptydazy I (TPPI) – lizosomalnej aminopeptydazy, enzymu kluczowego w degradacji białek. TPPI jest serynowo-karboksylową peptydazą usuwającą tripeptydy z N-końca polipeptydów. Jednym z naturalnych substratów TPPI jest podjednostka c mitochondrialnej syntazy ATP. Mutacje punktowe kodującego TPPI genu *CLN2* prowadzą do lizosomalnej choroby spichrzeniowej – klasycznej późnoniemowlęcej – ceroidolipofuscynozy neuronalnej (CLN2). Analiza mutacji reszt aminokwasowych rozmieszczonych na całej długości cząsteczki TPPI zapewne przyczyni się do pełnego poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tej choroby.

Oceniana praca licząca 119 stron przygotowana jest według zasad przyjętych dla dysertacji na stopień naukowy doktora w zakresie nauk eksperymentalnych. We wstępie teoretycznym obejmującym 17 stron Doktorant zaprezentował w sposób syntetyczny aktualny stan wiedzy odnośnie do ceroidolipofuscynoz neuronalnych, podał ich genetyczną klasyfikację i ogólną charakterystykę. Wiele uwagi poświęcił formie CLN2 przyczynę której należy upatrywać w braku aktywności enzymatycznej TPPI. W sposób wyczerpujący przedstawił dane dotyczące genu *CLN2* i jego mutacji, a także syntezy, dojrzewania i aktywności produktu jego ekspresji – TPPI.

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, tel. 042-635-44-89, fax 042-635-44-84
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl, e-mail: kcytobio@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
tel. 042-635-44-87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

Podczas czytania części teoretycznej nasunęły mi się następujące uwagi:

- Podrozdziały 1.2 i 1.3 powinny być połączone, gdyż to właśnie w podrozdziale 1.3 opisana jest główna funkcja lizosomów jaką jest enzymatyczna degradacja makrocząsteczek. Autor uniknąłby wówczas pewnych powtórzeń, np. tworzenia znacznika enzymów lizosomalnych, tj. mannozo-6-fosforanu (str. 13 i 16).
- W podrozdziale 1.3 na stronie 15 w składzie dołączonej do asparaginy podjednostki 14-monosacharydowej zabrakło cyfry 2 przy GlcNAc.
- Zwrot „kontekst sekwencyjny” zamieniłabym na „moduł sekwencyjny” (str. 16).
- Opis lizosomów w aspekcie ich funkcji powinien poprzedzać charakterystykę lizosomalnych chorób spichrzeniowych.
- Oligosacharyd przyłączony jest do asparaginy wiązaniem N- β -glikozydowym, a nie amidowym (str. 16).
- Aminokwasy znajdujące się w centrum aktywnym enzymu są odległe położone w jego strukturze I-rzędowej, a zatem nie powinno się je pisać z łącznikami, które symbolizują wiązania peptydowe między sąsiednimi aminokwasami (str. 17, 19).
- Określenie „enzym procesujący TPPI” zamieniłabym na „enzym biorący udział w obróbce TPP I” (str. 19).

Przedstawiony wstęp teoretyczny z cytowaniem 41 pozycji piśmiennictwa świadczy niewątpliwie o bardzo dobrej znajomości przedmiotu i dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań zaprezentowanych w części doświadczalnej. Wieloaspektowe badania form TPPI z mutacjami punktowymi na całej długości cząsteczki, które Autor określa muteinami, zapewne pozwolą na pełne poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw klasycznej późnoniemowłęczą ceroidolipofuscynozy neuronalnej. Moim zdaniem przedstawione na str. 43 cele pracy w liczbie 6 są raczej zadaniami badawczymi służącymi do realizacji wyżej podanego celu nadrzędnego.

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, tel. 042-635-44-89, fax 042-635-44-84
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl, e-mail: kcytobio@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
tel. 042-635-44-87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

Realizacja zaplanowanych badań była możliwa jedynie w laboratorium dobrze wyposażonym aparaturowo, dysponującym szeregiem technik inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, zasobnym w specjalistyczne odczynniki i linie komórkowe. Mgr M. Waluś miał możliwość realizacji pracy doktorskiej w wysokiej klasy laboratorium amerykańskim i w pełni ją wykorzystał. Bardzo różnorodne metody zastosowane w pracy zostały opisane w sposób przejrzysty i uzupełnione dwoma poglądowymi rycinami.

Do realizacji części doświadczalnej pracy Doktorant wybrał 14 mutacji zmiany sensu genu *CLN2*, z których dwie znajdowały się w części kodującej prosegment TPPI natomiast pozostałe 12 w części kodującej enzym. Skonstruował 15 plazmidów ze wstawką cDNA genu *CLN2* typu dzikiego (wtTPPI) oraz cDNA z wprowadzonymi 14 mutacjami typu zmiany sensu rozmieszczonymi na całej jego długości. cDNA TPPI z pojedynczo wprowadzonymi mutacjami poddano ekspresji w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) i zbadano poziom ekspresji i lokalizację poszczególnych mutein. Najwyższy poziom ekspresji wykazywał typ dziki TPPI oraz muteiny TPPI Arg127Gln i Pro544Ser. Najniższy poziom ekspresji miały komórki transfekowane wariantem TPPI Glu343Lys. W przypadku wtTPPI i mutein TPPI Arg127Gln, Ser475Leu i Pro544Ser około 90-95% enzymu było w formie dojrzałej. Analiza techniką immunofluorescencji z użyciem podwójnego znakowania i zastosowania laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego ujawniła ich lizosomalną lokalizację, natomiast pozostałe 11 mutein TPPI lokalizowało się w siateczce śródplazmatycznej. Zatem 11 badanych mutacji zaburzało prawidłowe dojrzewanie TPPI i transport do lizosomów. Część mutein TPPI z całkowicie lub prawie całkowicie zahamowanym transportem do lizosomów była przemieszczana na zewnątrz komórki w formie proenzymu, a wśród nich szczególnie muteina TPPI Ile287Asn. Stwierdzono ponadto, że oligomeryzacja – tworzenie nienatywnych dimerów 4 mutein TPPI (TPPI Pro202Leu, Gly284Val, Ile287Asn, Asn286Ser) sprzyja ich transportowi z ER do trans AG, a następnie sekrecji poza komórkę. Niektóre nieprawidłowo pofałdowane



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

muteiny zatrzymane w siateczce śródplazmatycznej były degradowane w szlaku ERAD. (ang. ER-associated degradation).

Ponadto z licznych wyników zawartych w pracy na uwagę zasługują ustalenia, że:

- 6 mutacji, tj. Pro202Leu, Arg206Cys, Gly284Val, Asn286Ser, Ile287Asn i Gln422His całkowicie uniemożliwia autokatalityczne usunięcie prosegmentu i aktywację enzymu.
- Większość mutein wykazuje aktywność na poziomie ~2,5% poziomu aktywności stwierdzonej w przypadku wtTPPI.
- Poza TPPI Asn286Ser pozostałe muteiny mają prawidłową liczbę przyłączonych do asparaginy oligosacharydów typu wysokomannozowego i kompleksowego.
- Inkubacja komórek w obniżonej temperaturze (28°C) indukowała wzrost poziomu dojrzałej formy enzymu w muteinach TPPI Val277Met, Arg447His, a w przypadku TPPI Arg447His wzrastała również jej komórkowa aktywność co wskazywało na poprawę fałdowania tej muteiny w ER i zwiększony jej poziom transportu do lizosomów.
- Inkubacja z dimetylosulfotlenkiem (DMSO) poprawiała dojrzewanie TPPI Val277Met.

Praca została zilustrowana bardzo czytelnymi rycinami w liczbie 21, w tym na 17 najczęściej złożonych rycinach, a także w 2 tabelach zaprezentowano wyniki pracy. Wszystkie ryciny opatrzone są bardzo szczegółowymi podpisami co jest ogromną zaletą tej pracy zdecydowanie ułatwiającą jej czytanie. Pewne braki występują jedynie w opisie Ryc. 14 i 18.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant sformułował osiem wniosków trafnie oceniających istotę prowadzonych badań.

Umiejętne zaplanowanie zakrojonych na szeroką skalę badań i konsekwentne ich realizowanie dostarczyło szereg oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i potencjalnie aplikacyjnym. W mojej opinii najważniejszym osiągnięciem Doktoranta, po przeanalizowaniu szeregu zmutowanych wariantów TPPI, jest ustalenie, że przyczyną braku aktywności TPPI w komórkach ludzi dotkniętych CLN2 jest nieprawidłowe pofałdowanie proenzymu większości mutein TPPI i zaburzenie transportu do lizosomów.

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, tel. 042-635-44-89, fax 042-635-44-84
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl, e-mail: kcytobio@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
tel. 042-635-44-87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Cytobiochemii

W rozdziale „Dyskusja” obejmującym 22 strony mgr M. Waluś w sposób bardzo wnikliwy przedyskutował wyniki przeprowadzonych badań rozpatrując je w powiązaniu z przestrzennym modelem TPPI (Ryc. 21) i licznymi danymi literaturowymi. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z dużą starannością i co należy podkreślić napisana jest poprawną polszczyzną z nielicznymi niezręcznościami językowymi np. „analizowano immunoblottingiem” str. 51, „analizowano przez immunoblotting” str. 78, misfałdowanie mutein (dyskusja). W pracy nie ma jednolitości w zapisie symboli aminokwasów.

W rozprawie wykorzystano 109 pozycji literaturowych, spośród których około 60% pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowując stwierdzam, że mgr M. Waluś w przedłożonej mi do oceny dysertacji podjął z sukcesem próbę rozwiązania ważnego problemu naukowego jakim jest molekularne podłoże jednej z chorób lizosomalnych.

Doktorant wykazał się wyjątkowym przygotowaniem teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz przeprowadził pracochłonne badania wymagające doświadczenia z zakresu technik inżynierii genetycznej i biologii molekularnej.

Uważam, że praca doktorska mgr Mariusza Walusia spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ o dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Anna Lipińska

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, tel. 042-635-44-89, fax 042-635-44-84
www.cytobiochemia.uni.lodz.pl, e-mail: kcytobio@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda M. Krajewska
tel. 042-635-44-87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl