



Wrocław, 20 lutego 2013 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Iwony Sokołowskiej zatytułowanej:

„Wpływ zmiany konformacji i hydrofobowości podjednostki A rycyny
na wewnątrzkomórkowy transport tej toksyny”

Rozprawa doktorska mgr Sokołowskiej obejmuje badania wewnątrzkomórkowego transportu toksyny roślinnej rycyny oraz udziału w tym procesie opiekuńczych białek retikularnych EDEM1 i EDEM2. Biorąc pod uwagę, że rycyna - modelowe białko użyte w tej pracy - jest jedną z najsilniejszych toksyn, którą często próbuje wykorzystywać się w terapii przeciwnowotworowej, określenie mechanizmu jej transportu ma znaczenie zarówno dla zrozumienia procesów transportu białek w komórce, jak i dla opracowania nowych leków lub szczepionek. Tak więc ze względów aplikacyjnych i podstawowych temat doktoratu można uznać za ważny i interesujący.

Rozprawa doktorska mgr Sokołowskiej to 136-stronnicowy maszynopis napisany po polsku i podzielony na tradycyjne części (Streszczenie, napisany po angielsku *Abstract*, *Wstęp*, *Cele pracy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* i *Literatura*). Niestety w rozprawie brakuje wykazu stosowanych w pracy skrótów. Przydałyby się również zwięzłe sformułowane konkluzje. Praca jest napisana i zilustrowana starannie, zawiera jednak pewną ilość błędów interpunkcyjnych i typograficznych, a zdarzają się niestety również, na szczęście nieliczne, błędy ortograficzne. Z punktu widzenia formalnego, praca w pełni odpowiada standardom pisania manuskryptów publikacji z badań doświadczalnych.

W obszernym *Wstępie* do rozprawy, liczącym 24 strony, autorka przedstawia wewnątrzkomórkowy transport białek, skupiając się na budowie i roli siateczki śródplazmatycznej, procesach zwijania i glikozylacji białek tam zachodzących oraz mechanizmach kierowania białek do degradacji. Doktorantka szerzej przedstawia białka EDEM1 i EDEM2, a następnie opisuje rycynę, główny przedmiot badań. Lektura *Wstępu* dobrze wprowadza w tematykę rozprawy doktorskiej i zawiera wszelkie dane istotne dla zrozumienia rozprawy doktorskiej.

Podobnie wyczerpująco zostały napisane rozdziały *Materiały* i *Metody*, w których doktorantka obszernie i wnikliwie przedstawia wszelkie szczegóły techniczne przeprowadzanych doświadczeń, w tym metody biologii molekularnej i komórkowej, techniki biochemiczne i biofizyczne, metody otrzymywania białek rekombinowanych stosowanych w pracy czy testy immunologiczne.

W rozdziałach *Wyniki* i *Dyskusja* mgr Sokołowska opisała i skomentowała przeprowadzone doświadczenia. Ogólna koncepcja pracy doktorskiej związana jest z publikacją Simpsona i wsp. (1999), w której autorzy opisują mutację Pro250Ala w łańcuchu A rycyny powodującą 170-krotny spadek cytotoksyczności rycyny wobec komórek Vero. Autorka podjęła się określenia mechanizmu powodującego ten efekt, w tym udziału białek opiekuńczych EDEM1 i EDEM w transporcie z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu. Wprowadzenie przez doktorantkę mutacji Pro250Ala powodowało znacznie niższe niż w oryginalnej pracy, bo 9-krotne, obniżenie cytotoksyczności w komórkach Vero i Hek293. Doktorantka jednocześnie pokazała, że mutacja ta skutkuje znacznie podwyższoną degradacją lizosomalno-endosomalną białka oraz zmniejszoną wydajnością transportu z retikulum do cytozolu. Autorka pokazała także, że białka opiekuńcze EDEM1 i EDEM2 nie rozpoznają zmutowanej podjednostki A rycyny i nie są zaangażowane w jej retrotranslokację z retikulum do cytozolu. Podobne wyniki doktorantka uzyskała także dla mutantów białek o zmienionej hydrofobowości w regionie 245-256 podjednostki A oraz dla białka BACE o obniżonej hydrofobowości w rejonie końca C. Są to ważne wyniki, gdyż pokazują, że odpowiedni poziom hydrofobowości w determinantach rozpoznawanych przez wspomniane białka opiekuńcze jest istotny dla dalszych losów białek w komórce. Doktorantka wskazała także na udział katepsyn B i D w degradacji rycyny zawierającej omawianą mutację. Ważnym wnioskiem płynącym z omawianych tu badań jest możliwość zastosowania mutantu Pro250Ala jako składnika immunotoksyny o zoptymalizowanym działaniu i zmniejszonych skutkach ubocznych.

Opisane powyżej najważniejsze wyniki doktoratu uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe. Należy też podkreślić, że realizując doktorat mgr Sokołowska stosowała szereg technik oczyszczania białek, biologii molekularnej i biologii komórkowej, a także techniki immunologiczne, biochemiczne i spektroskopowe. Opanowanie w czasie realizacji doktoratu różnorodnych technik, obok uzyskania wartościowych wyników, znajomości literatury czy umiejętności zinterpretowania i opisanie wyników, jest jednym z głównych celów stawianych na tym etapie rozwoju naukowego.

Kilka uwag odnośnie doktoratu:

1. Wprawdzie w tytule rozprawy pojawia się określenie „zmiany konformacji i hydrofobowości...” to podstawienie Pro250Ala omawiane jest w doktoracie zasadniczo w kontekście zmiany hydrofobowości, jaką wywołuje. Tymczasem jest to mutacja, która może prowadzić do bardzo istotnych zmian w konformacji podjednostki A rycyny. Nawet jeżeli wyniki analizy widm CD odnośnie udziału poszczególnych typów struktur drugorzędowych (str. 68) są przeszacowane (co jest prawdopodobne), to szereg wyników uzyskanych w doktoracie można tłumaczyć efektem konformacyjnym a nie tylko hydrofobowym wprowadzonego podstawienia. Prosiłbym o komentarz na ten temat w czasie publicznej obrony.
2. W tekście doktoratu jest istotna nieścisłość odnośnie cytowania kluczowej publikacji Simpsona i wsp. (1995), w której przedstawione są oryginalne wyniki dla podstawień aminokwasowych w segmencie hydrofobowym łańcucha A rycyny, w tym jakże istotnej dla doktoratu mutacji Pro250Ala. Publikacji tej nie ma w wykazie literatury (jest zaś w wykazie publikacja Simpsona i wsp. z 1999 roku).
3. W jakich warunkach rejestrowano widmo CD dla formy zdenaturowanej wariantu Pro250Ala? Nie przypomina ono swym kształtem widma białka zdenaturowanego, a w doktoracie nie znalazłem informacji dotyczącej warunków denaturacji.
4. Osobiście nie używałbym pronazy do trawienia substratów białkowych w celach analitycznych. Pronaza jest mieszaniną enzymów proteolitycznych wydzielanych zewnątrzkomórkowo przez *Streptomyces griseus* a jej skład może podlegać różnicom w zależności od preparacji, podobnie jak w przypadku soku trzustkowego.
5. W rozdziale 5.3 doktorantka podaje warunki trawienia proteolitycznego podjednostki A rycyny. Prosiłbym o wytłumaczenie dlaczego stosowano tak ogromny nadmiar molowy enzymu proteolitycznego w stosunku do substratu, szczególnie dla proteiny K, ale także dla trypsyny i pronazy.
6. Na stronie 96 autorka opisuje dwie mutacje Val245Ala i Ala253Leu jako podwyższające hydrofobowość. Mutacja Val245Ala obniża hydrofobowość, gdyż reszta waliny jest znacznie bardziej hydrofobowa niż alaniny. Prosiłbym o komentarz.
7. Również proszę o wyjaśnienie drugiego zdania *Wstępu*: Przyjmuje się, że typowa komórka ludzka syntetyzuje między 20 000 a 100 000 różnych typów białek...”.

Drobne uwagi:

1. Sformułowanie „N-terminalny koniec” jest niefortunne (str. 13).

2. Prawidłowa nazwa to Narodowe Instytuty Zdrowia, a nie Narodowy Instytut Zdrowia (str. 112).
3. Str. 114: inhibitor Katepsyny B to ester metylowy CA074 a inhibitor Katepsyny D to pepstatyna, a nie odwrotnie.

Nie mam ponadto istotnych zastrzeżeń do treści rozprawy i opisanych w niej badań.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Iwony Sokołowskiej zatytułowanej: „Wpływ zmiany konformacji i hydrofobowości podjednostki A rycyny na wewnątrzkomórkowy transport tej toksyny” jest wysoce pozytywna a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego mgr Iwony Sokołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Otlewski

