

25 LUT 2013



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i
Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. (22) 659-2240
fax. (22) 658-4176
email: stepien@ibb.waw.pl

22 lutego 2013

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Iwony Sokołowskiej pt. " Wpływ konformacji i hydrofobowości podjednostki A rycyny na wewnątrzkomórkowy transport tej toksyny"

Rycyna jest białkiem obecnym w nasionach rącznika pospolitego i należy do najsilniejszych toksyn znanych w przyrodzie. Jest to heterodimer złożony z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym.

Za wiązanie się do receptorów komórkowych odpowiedzialny jest łańcuch B, natomiast łańcuch A jest aktywny enzymatycznie i wykazuje aktywność N-glikozydazy RNA. Aktywność ta jest odpowiedzialna za hamowanie translacji na rybosomach cytoplazmatycznych poprzez usuwanie reszty adenylowej z cząsteczki 28S rybosomalnego RNA. W ten sposób rycyna doprowadza w efekcie do śmierci komórki. Ponieważ pojedyncza cząsteczka rycyny jest zdolna do inaktywacji ok. 2 tysięcy rybosomów, rycyna należy do niezwykle silnych trucizn, jej dawka śmiertelna u ssaków wynosi ok. 0.1 ug na kilogram wagi ciała.

Badania nad mechanizmem toksyczności rycyny mają bardzo duże znaczenie dla rozwoju terapii przeciwnowotworowych. Od wielu lat trwają badania nad wykorzystaniem toksyczności rycyny i zastosowaniem jej w tworzeniu tzw. immunotoksyn, gdzie z cząsteczką rycyny sprzężone jest przeciwciało rozpoznające specyficzne antygeny na powierzchni komórek nowotworowych. W założeniach takiego podejścia eksperymentalnego internalizacja rycyny ma spowodować śmierć komórek nowotworowych.

Drugim ważnym zastosowaniem rycyny w medycynie wydaje się zdolność zmutowanej in vitro podjednostki A do stymulowania produkcji przeciwcia u pacjentów. Oprócz powyższych teoretycznych zastosowań w medycynie, rycyna stanowi dobry model do badań nad wewnątrzkomórkowym transportem białek.

Z powyższych powodów podjęcie się przez panią mgr Iwonę Sokołowską badań nad mechanizmami interakcji rycyny z wewnątrzkomórkowymi ścieżkami transportu białek było w pełni uzasadnione.

Autorka postawiła jako cele pracy zbadanie następujących zagadnień : ustalenie czy zmiana konformacji cząsteczki rycyny będzie mieć wpływ na jej cytotoksyczność oraz jej transport wewnątrzkomórkowy, oraz ustalenie roli białek opiekuńczych EDEM1 i EDEM2 z retikulum endoplazmatycznego w transporcie rycyny.

W celu przeprowadzenia tych badań, doktorantka wykonała mutagenezę in vitro, w wyniku której w cząsteczce podjednostki A rycyny we fragmencie hydrofobowym nastąpiła zamiana prolina w pozycji 250 na alaninę (P250A). Badania wstępne polegały na ekspresji takiego konstrukt w bakteriach i rekonstytucji dimeru rycyny. Wprowadzona mutacja nie zmieniła aktywności enzymatycznej uzyskanego białka, jednak badania cytotoksyczności udowodniły znaczące, dziewięciokrotne obniżenie aktywności w porównaniu z rycyną typu dzikiego.

Mając do dyspozycji wyżej opisany układ doświadczalny, autorka wykonała szereg badań nad mechanizmami cytotoxiczności rycyny. Okazało się, że zmiana w rejonie hydrofobowym ma wpływ na transport rycyny z retikulum cytoplazmatycznego do cytosolu, a także na zwiększoną degradację zmutowanej rycyny przez układ endosomalno-lizosomalny. Autorka wysunęła hipotezę, że przyczyną obniżenia toksyczności zmutowanej rycyny są powyższe zmiany.

W dalszej części prac nad doktoratem pani mgr Sokołowska skoncentrowała swoje badania nad zależnością transportu rycyny od białek opiekuńczych EDEM1 i EDEM2. Zastosowała w tym celu nowoczesne techniki biologii molekularnej, wyciszając ekspresję tych genów za pomocą siRNA. Uzyskane wyniki sugerują, że EDEM1 lub EDEM2 nie są odpowiedzialne za transport zmutowanej formy białka, choć EDEM1 oddziałuje z białkiem typu dzikiego. Dalsze badania udowodniły, że zmiana w rejonie hydrofobowym rycyny zmienia strukturę

drugorzędową białka, która charakteryzuje się większą ilością struktur helikalnych i obniżeniem poziomu struktur beta-kartki.

Uwzględniając powyższe wyniki, autorka postanowiła uzyskać dodatkowe zmutowane białka, które charakteryzowały się podwyższoną lub obniżoną hydrofobowością. Obie formy okazały się słabiej wiązać do powierzchni komórki oraz ulegać sulfatacji w aparacie Golgiego. Zmiany parametru hydrofobowości okazały się także istotne dla interakcji z białkami EDEM i stabilności rycyny w komórce.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez doktorantkę wskazały na istotne znaczenie rejonu hydrofobowego podjednostki A rycyny w transporcie i funkcjonowaniu tego białka. Autorka zastosowała w swoich badaniach szereg nowoczesnych metod biologii molekularnej, prawidłowo planowała swoje doświadczenia i analizowała uzyskane wyniki. Tym samym wykazała biegłość w eksperymentach, ich planowaniu i interpretacji. Przedstawiona praca prezentuje nowe, cenne wyniki i wzbogaca wiedzę na temat funkcjonowania rycyny: toksyny niezwykle ważnej dla rozwoju nowych metod walki z nowotworami oraz dla zastosowań w indukcji odpowiedzi immunologicznej u pacjentów. Praca napisana jest poprawnie, dokumentacja eksperymentów jest zgodna ze stosowanymi standardami.

Moje uwagi krytyczne dotyczą jedynie problemów natury edytorskiej: wstęp jest nieco za długi i niepotrzebnie zbyt szczegółowo omawia strukturę retikulum cytoplazmatycznego. Z kolei pierwszy ustęp dyskusji, nie należy do dyskusji, ale jego miejsce powinno być we wstępie.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny przedstawionej rozprawy doktorskiej. Z powyższych powodów stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa pani mgr Iwony Sokołowskiej spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani mgr Iwony Sokołowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIwersytet warszawski
WYDZIAŁ BIOLOGII
Instytut Genetyki i Biotechnologii
prof. dr hab. Piotr Stępień