



dr hab. Antonina Mazur, prof. UWrocław
antonina.mazur@uwr.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Sowy-Rogozińskiej
pt.: „Rola kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego (ER)
w transporcie rycyny z ER do cytozolu”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Moniki Słomińskiej-Wojewódzkiej, prof. UG
na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy badań podstawowych mających na celu ustalenie, który z kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego (ER) bierze udział w transporcie z ER do cytozolu rycyny, która jest białkową toksyną, mogącą prowadzić do śmierci człowieka i innych zwierząt. Wiadomo, że rycyna podczas translokacji z ER do cytozolu wykorzystuje maszynę procesu degradacji białek związanego z ER (ERAD), jednakże mechanizm tego procesu nie jest do końca poznany. Poznanie mechanizmu translokacji tego białka z ER do cytozolu mogłoby pozwolić na opracowanie skutecznego antidotum na tę toksynę lub na wykorzystanie tej toksyny w terapii przeciwnowotworowej. Dlatego też badania przeprowadzone przez mgr Natalię Sowę-Rogozińską są ważne.

Rozprawa doktorska, obejmująca 173 strony, ma typowy układ dla tego typu prac. Jest podzielona na następujące rozdziały: **Wstęp**, **Hipoteza badawcza i cele pracy**, **Materiały**, **Metody**, **Wyniki**, **Podsumowanie**, **Dyskusja**, oraz **Literatura**. W pracy znajdują się ponadto **Wykaz skrótów**, **Streszczenia** w językach polskim oraz angielskim, **Spis rysunków**, **Wykaz tabel** oraz rozdział, w którym opisano **Dorobek naukowy** Doktorantki. W odniesieniu do Wykazu skrótów należy wspomnieć, że brakuje w nim wytłumaczenia kilku skrótów, które pojawiły się w rozprawie, tj. APS,

CM, DEPC, DMSO, EDTA, SDS-PAGE, TAE, TBE oraz TEMED. Z kolei wydaje mi się, że ogólnie znane skróty, np., ang., n, rys. czy tab., niepotrzebnie zostały umieszczone w spisie skrótów.

Wstęp został bardzo dobrze napisany, co powoduje, że czyta się go płynnie. Znajdują się w nim informacje dotyczące roli retikulum endoplazmatycznego (ER) w rozpoznawaniu źle sfałdowanych białek, które miałyby być wydzielone poza komórkę. Następnie wytłumaczono, na czym polega proces degradacji białek związany z ER (ERAD). Idąc dalej, opisane zostały także budowa oraz rola w procesie ERAD kanałów błonowych ER, budowanych przez białka Sec61, białka Derlin oraz kompleks HRD1-SEL1L. W tym rozdziale poruszono również kwestie dotyczące działania białkowej toksyny - rycyny, jej internalizacji przez komórkę oraz transportu z ER do cytozolu. Ta część pracy jest bardzo obszerna, co pozwala na wyczerpujące opisanie ww. kwestii. Na podstawie informacji zebranych w tym rozdziale wywnioskowano, że nie wiadomo, jaka jest rola translokonu Sec61 oraz kanałów budowanych przez białka Derlin w transporcie rycyny do cytozolu. Omawiając ten rozdział, mam tylko kilka ostatnich próśb do Doktorantki. Czy mogłabym prosić o wytłumaczenie, co oznacza sformułowanie „domena glukozowa” (str. 22)? Czy chodzi tutaj o domenę wiążącą glukozę, występującą w białkach kalneksynie i kalretikulinie? Czy mogłabym prosić o wytłumaczenie roli i mechanizmu działania białek XTP3B oraz OS9 w rozpoznawaniu glikoprotein kierowanych do degradacji? O tych białkach Doktorantka wspomina na stronach 25 i 26. Chciałabym się także dowiedzieć, w jaki sposób dochodzi do otwarcia kanału Sec61 (rozdział 4.5.1). Brakuje także wyjaśnienia, czym jest motyw SHP na C-końcu białka Derlin-1 (str. 36). W odniesieniu do tego białka nie ma również informacji w legendzie do rys. 6, o jakie konformacje chodzi, gdy Doktorantka pisze o konformacjach oznaczonych kolorami czerwonym oraz niebieskim. W podrozdziale 4.7.1 można było podać pomiędzy którymi resztami cysteiny tworzony jest mostek disiarczkowy, odpowiadający za połączenie peptydów RTA i RTB.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia **Hipotezę badawczą**, mówiącą o tym, że RTA (podjednostka A) rycyny selektywnie wykorzystuje kanały błonowe ER podczas retranslokacji z ER do cytozolu. Następnie jasno zostały określone **Cele** przyświecające omawianej pracy.

W kolejnych dwóch rozdziałach **Materiały** i **Metody** zostały wymienione odczynniki, plazmidy, esiRNA, sprzęty, itd. użyte podczas realizacji pracy doktorskiej, a także opisane dość wyczerpująco protokoły poszczególnych eksperymentów. Brakuje mi w tej części pracy podania numerów katalogowych zastosowanych materiałów. Dodatkowo pochodzenie rycyny nie zostało podane w Materiałach, czy rycyna była uzyskiwana przez Grupę, w której Doktorantka realizowała swoją pracę doktorską? Niefortunnym zabiegiem było wymienienie poszczególnych linii komórkowych / odczynników / roztworów, itd. w formie podrozdziałów. W części **Metody** brakuje opisu izolacji linii komórkowej HDFa, nie znalazłam także nigdzie charakterystyki tych komórek

(analiza obecności specyficznych dla tych komórek markerów). Sposób przeprowadzania analizy densytometrycznej nie został opisany w pracy. Brakuje informacji, w jakiej ilości znajdował się kwas wersenowy w roztworze zawierającym trypsynę. Wątpię, aby użyte w pracy plazmidy niosły geny kodujące np. GFP, są to zapewne sekwencje kodujące. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie, czym jest kontrolne cDNA (str. 52)? Sekwencje esiRNA powinny zostać podane. Czy w procesie jałowienia nie stosowano podwyższonej temperatury? Na przykład na stronie 52 napisano, że „podłoże było jałowione przez 20 minut przy ciśnieniu 0,7 atmosfery.” Czy te warunki są wystarczające do sterylizacji płynów? Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie, dlaczego tyle różnych par starterów było używanych w celu detekcji transkryptów kodujących badane białka? Czym różnią się odczynniki wymienione w podrozdziałach 6.13 od 6.14? Na rys. 13 pokazano analizę produktów PCR, dla których podane wartości pz nie odpowiadają żadnej z par starterów wymienionych w Materiałach. Nie podano informacji, w czym rozpuszczono paraformaldehyd, czy był to PBS? Czy wszystkie typy komórek były wysiewane w takich samych ilościach, jak to podano w tabeli 5? SDS-PAGE zapewnia warunki redukujące, ale ważniejszą cechą tego typu elektroforezy białkowej jest zapewnienie warunków denaturujących (np., str. 87 i 88).

W części „**Wyniki**” Autorka rozprawy właściwie przedstawia rezultaty swoich badań. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wartościowe i przyczyniają się lepszemu zrozumienia, jakie funkcje pełnią izoformy białka Sec61 α oraz białka z rodziny Derlin w transporcie podjednostki A rycyny z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu w komórkach Hek293 oraz Vero. Najciekawszymi wynikami są dla mnie te dotyczące wpływu izoformy 2 białka Sec61 α na transport rycyny w małych komórkach Vero. Innym intrygującym odkryciem jest ustalenie, że w przypadku wyciszenia ekspresji genów kodujących obie izoformy białka Sec61 α dochodzi do zwiększenia ilości transkryptów kodujących z białka z rodziny Derlin. Mam do Doktorantki kilka pytań odnośnie wyników, mam też kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie, dlaczego postanowiono zbadać następujące linie komórkowe: HEK293, Vero, HDFa i HeLa? W analizach poziomu transkryptów kodujących wybrane białka nie powinny też zostać uwzględnione transkrypty białek Sec61 β i γ , skoro budują one translokon Sec61? Zastanawia mnie, dlaczego używano esiEGFP w stężeniu 5 nM jako kontroli, podczas gdy w przypadku esiPOI stosowano większe stężenia. Czy esiEGFP nie powinno być podawane w tym samym stężeniu, co esiPOI? Podoba mi się natomiast podejście Doktorantki do wyboru genu referencyjnego w analizie qPCR. Niestety wciąż niedostatecznie przykładą się wagę do tego aspektu, a może to mieć istotny wpływ na końcowe wyniki. Czy mogłabym prosić o podanie informacji dla jakich komórek i warunków została przeprowadzona ta analiza? W rozdziale 8.1.2.2 brakuje pokazania wydajności wyciszenia ekspresji

SEC61A1 i *SEC61A2* na poziomie białka. Ponadto nie jest dla mnie jasnym, co było tutaj warunkiem kontrolnym. Notabene w przypadku pozostałych wyników z eksperymentów polegających na wyciszaniu ekspresji *SEC61A1* *SEC61A2* też brakuje informacji, co było warunkiem kontrolnym. Czy należy uznać, że przy tego typu eksperymentach było to 5 nM esiEGFP? W przypadku testu polegającego na badaniu transportu RTA z ER do cytozolu należało zbadać obecność jakiegoś markera cytozolu, aby dowieść, że mamy do czynienia rzeczywiście z cytozolem, beta-aktyna jest praktycznie w każdym kompartmentcie komórkowym, więc nie może być ona uznana za taki marker. Należało także przeprowadzić analizę densytometryczną ilości RTA we frakcji membranowej w badanych warunkach. Ciekawa jestem, czy badane warunki wpływają w jakiś sposób na ilość RTA w ER. W rozdziale 8.1.5 należało zawrzeć wynik uzyskany metodą Western blotting, pokazujący, czy dochodzi do obniżenia ilości białka Sec61 α 2 po traktowaniu komórek Hek293 esiSec61A1. Generalnie, uważam, że dla obu linii komórkowych, dla których przeprowadzono główne eksperymenty, należało ustalić, jaki jest poziom białka Sec1 α (zakładam, że stosowane przeciwciało rozpoznaje obie badane izoformy) w każdych badanych warunkach, tj. kontroli, + esiSec61A1, + esiSec61A2 oraz + (esiSec61A1 + esiSec61A2). To by może pozwoliło na pośrednie ustalenie orientacyjnej ilości każdej z ww. izoform w badanych komórkach. Zastanawia mnie także, dlaczego nie sprawdzono poziomu białek Derlin (Western blotting) po traktowaniu komórek esiSec61A1 + esiSec61A2 (rozdział 8.1.7). Szkoda, że w przypadku komórek Vero nie sprawdzono poziomu białek Derlin w badanych warunkach.

Poniżej wymienię mniej istotne uwagi dotyczące części **Wyniki**. Na większości zdjęć mikroskopowych brakuje czytelnej skali, wiem, że powiększenie zostało podane w legendzie, ale skala powinna być zostać pokazana. W przypadku rys. 15 i rys. 27 brakuje pokazania nałożenia obrazu uzyskanego w świetle przechodzącym z obrazem uzyskanym po detekcji fluorescencji. Na rys. 12 nie podano dla jakiej / jakich próbek pokazano przykładowe wyniki. Zakładam, że dla wszystkich próbek uzyskano podobny wynik analizy. Ta sama uwaga tyczy się rys. 21A.

W **Dyskusji** Autorka rozprawy krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i porównuje je z danymi opisanymi w dostępnej literaturze. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana. Dobrze, że nie są tutaj powtarzane opisy wyników. Na podstawie lektury tej części rozprawy można wysnuć wnioski o dojrzałości naukowej Doktorantki. Do tej części pracy nie mam zastrzeżeń.

Przechodząc już do oceny rozprawy pod kątem formalno-edytorskim, należy zwrócić uwagę na fakt, że praca została napisana poprawnie pod kątem językowym i jest bardzo starannie zredagowana, co zasługuje na pochwałę. Pojawiło się w niej niewiele literówek oraz drobnych błędów gramatycznych. Moim zastrzeżeniem w tym punkcie jest nagminne niestosowanie przecinka /

przecinków wyodrębniającego / wyodrębniających część zdania z imiesłowem przysłówkowym. W paru miejscach zauważyłam inne błędy interpunkcyjne, ale jest ich stosunkowo niewiele. Wydaje mi się także, że następujące zdanie nie jest poprawne, a tego typu sformułowania nagminnie pojawiały się w Materiałach. „Po zmieszaniu substancji uzupełniono do 5 l wodą destylowaną” – nie wiadomo, co uzupełniono. Drobniejsze niedociągnięcia (np., skróty myślowe czy kolokwializmy) wymieniam poza recenzją.

Doktorantka wymienia 198 pozycji w części **Literatura**. Mniej niż połowa zacytowanych pozycji (<80) pochodzi z ostatnich 10 lat. Zastanawia mnie, czy powodem tego jest mniejsze zainteresowanie procesami poruszonymi w ocenianej rozprawie na przestrzeni ostatnich lat. Nie zmienia to jednak faktu, że pozycje literaturowe zostały prawidłowo dobrane pod kątem badanej tematyki, co świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki. Nie rozumiem tylko, dlaczego w spisie literatury poszczególne pozycje są numerowane, skoro lista cytowań została uszeregowana zgodnie z alfabetem, a w tekście cytowania są wymieniane z zachowaniem nazwisk pierwszych autorów. Źródła internetowe zostały prawidłowo przywołane. Brakuje odniesienia literaturowego do danych opublikowanych przez FAOSTAT, a przytoczonych przez Doktorantkę na str. 47. Notabene przypuszczam, że FAOSTAT jest jakimś skrótem, który nie został wyjaśniony.

Pomimo wymienionych błędów oraz uchybień recenzowana praca charakteryzuje się sporą wartością poznawczą. Założone cele zostały zrealizowane. Doktorantka jest raz pierwszym autorem, a raz współautorem dwóch prac przeglądowych, które są powiązane z tematem pracy doktorskiej. Pierwsza publikacja pt.: „*Toxins utilize the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway in their intoxication process*” ukazała się w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* w 2019 r. Natomiast druga praca przeglądowa, w której mgr Sowa-Rogozińska jest pierwszym autorem, pt.: „*Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin*” została opublikowana w czasopiśmie *Toxins* również w 2019 r.

Rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). **Reasumując, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne wnioski o dopuszczenie mgr Natalii Sowy-Rogozińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologicznych.**

Antonina Ulew.

Przykładowe usterki stylistyczne, edytorskie oraz drobniejsze błędy, które pojawiły się w pracy:

gdy dana praca jest pisana w języku polskim należy pisać Western blotting, a nie Western blot;
brakuje skrótów (w/o i o/o), opisujących rodzaj stężenia wyrażonego w %;
tytuły tabel powinny być zakończone kropką;
str. 6 EGFP to nie jest „plazmid niosący gen”;
str. 16 „[...] przy imporcie z cytozolu do jądra [...]” - powinno być „[...] przy imporcie z cytozolu do jądra komórkowego [...]”; rys. 9, str. 73 – ta sama uwaga;
str. 17 „W trakcie syntezy białek szlaku sekrecji [...]” – skrót myślowy;
str. 23 „Retikulum endoplazmatyczne, poza kluczową rolą w procesach zwijania białek, odpowiada również za utrzymanie właściwej równowagi między procesami fałdowania a degradacji, która pozwala na utrzymanie homeostazy komórkowej i prawidłowe funkcjonowanie komórek [...]” – nie jest jasne, o jakie fałdowanie i degradację chodzi;
str. 29 „Sec61 [...], który całkowicie obejmuje dwuwarstwową błonę lipidową” – kolokwializm;
str. 36 „[...] tetrameryczny translokon z bramką boczną w bonie ER” – nie jest dla mnie jasnym, o jaką bramkę chodzi w tym punkcie;
str. 37 „eksonów” – powinno być egzonów;
str. 41 „[...]”, która niesie wysoce konserwatywną mutację Gly255Arg. Na skutek mutacji białek z grupy Vsp [...]” – białka nie ulegają mutacjom;
str. 66 „hodowano w zsuplementowanej pożywce” – „zsuplementowana” to raczej nie jest polskie słowo;
str. 71 zamiast „Detekcja Mycoplasma” powinno być „Detekcja bakterii z rodzaju *Mycoplasma*”;
str. 121 „Kontrolę doświadczenia stanowiły komórki transfekowane wektorem kontrolnym (Materiały 6.11.1).” – w tym rozdziale jest wymienione esiGFP, a nie wektor kontrolny;
rys. 9 „przestrzeń zewnątrzkomórkowa” – powinno być pozakomórkowa;
rys. 10 – brakuje informacji i ewentualnie referencji, w jakim programie został wykonany ten rysunek;
rys. 26 – podpisy na osi x są nieprawidłowe, zamiast np. DERL1 powinno być np. esiSec61A1 + esiSec61A2.