



Warszawa, 14 października 2024 r.

dr hab. Adrianna Skoneczna, prof. instytutu
Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk
Pracownia Mechanizmów Stabilności Genetycznej

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

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Sowy-Rogozińskiej zatytułowana „Rola kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego (ER) w transporcie rycyny z ER do cytozolu” wykonana została na wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej, pod opieką Pani dr hab. Moniki Słomińskiej-Wojewódzkiej, profesora tej uczelni. Oceniana praca ta wpisuje się w zakres prowadzonych przez Panią Promotor badań dotyczących roli transportu wewnątrzkomórkowego w regulacji homeostazy białek i detoksykacji komórek. W swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Natalia Sowa-Rogozińska próbuje odpowiedzieć na pytanie, czy kanały w błonie retikulum endoplazmatycznego, mogą być wykorzystywane podczas retrotranslokacji białek z retikulum endoplazmatycznego (ER) do cytozolu, przy czym jako układ badawczy wykorzystywane są ludzkie i małe linie komórkowe, a możliwość transportu wstecznego testowana jest z wykorzystaniem cytosolowego efektu rycyny. Dane uzyskane w tych badaniach oprócz informacji z dziedziny nauk podstawowych dotyczących budowy kanałów błonowych, regulacji ich powstawania oraz sposobów selekcji transportowanych cząsteczek, mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmu toksyczności śmiertelnie działającego związku – rycyny.

Rozprawa doktorska pani mgr Natalii Sowy-Rogozińskiej jest obszerna (173 strony), obejmuje: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp (33 strony), Hipotezę badawczą i cele pracy, Materiały (16 stron), Metody (26 stron), Wyniki (44 strony), Podsumowanie, Dyskusję (9 stron), Literaturę (198 pozycji) oraz informację o dorobku naukowym Doktorantki. Jej dorobek publikacyjny to cztery publikacje w pismach z listy JCR, z czego dwie z prac to prace przeglądowe związane tematycznie z rozprawą doktorską (w jednej z nich Doktorantka jest pierwszą autorką [*Int. J. Mol. Sci.* (2019) 20(6):1307.; *Toxins (Basel)* (2019) 11(6):350.]), kolejne dwie prace są pracami badawczymi, nie związanymi jednak z tematyką rozprawy [*Int. J. Mol. Sci.* (2021) 23(1):117.; *Acta Biochim. Pol.* (2017) 64(4):699-704.]. Łączny współczynnik wpływu tych prac IF z roku ich powstania to 15,534 ($IF_{5-letni} = 16,654$). Warty podkreślenia i docenienia jest fakt, że prace te cytowane były łącznie 91 razy, a najwyższy indeks cytowań ma praca, której pierwszą autorką jest Pani mgr Natalia Sowa-Rogozińska. Współautorstwo w/w prac pozwala stwierdzić, że wymogi formalne dotyczące autorstwa opublikowanych prac stawiane Doktorantom zostały

spełnione. Dla wygody czytelnika przygotowane zostały również: wykaz używanych w pracy skrótów oraz spis rysunków i tabel.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest dobrze skonstruowany; sukcesywnie wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Rozpoczynając od ogólnych informacji na temat transportu wewnątrzkomórkowego białek, poprzez rolę retikulum endoplazmatycznego (ER) w transporcie, składaniu, kontroli jakości i degradacji białek, Doktorantka przechodzi do szczegółowych opisów tych aspektów przedstawianych procesów, z którymi bezpośrednio związane są prowadzone przez nią badania. Dowiadujemy się zatem więcej o transporcie białek poprzez błonę ER, ze szczególnym uwzględnieniem transportu wstecznego do cytozolu; o znanych sposobach regulacji transportu białek do i z ER; o zaangażowanych w te procesy białkach (m.in. białka z rodziny Derlin czy zaangażowane w transport różnych substratów ligazy ubikwityny E3); o budowie kanałów błonowych w ER, z uwzględnieniem kompleksu Sec61; a wreszcie o substratach ERAD, w tym egzogennych, takich jak rycyna. Wstęp jest generalnie dobrze napisany i świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu przez Doktorantkę. Opatrzony został również licznymi starannymi ilustracjami. Nawiasem mówiąc, ilustracje i schematy są mocną stroną tej dysertacji.

Lektura Wstępu inspirowuje do poproszenia o szersze omówienie/przedyskutowanie kilku wątków poruszonych w tym rozdziale rozprawy doktorskiej:

- We Wstępie omawiane były m.in. teorie związane z mechanizmem działania kanału Sec61 podczas transportu białek pomiędzy ER a cytozolem. *Proszę o szersze omówienie roli tego kanału w transporcie białek do i z ER. Jakie argumenty/dowody przemawiają za tym, że kompleks Sec61 bierze udział w retrotranslokacji, z ER do cytozolu, białek przeznaczonych do degradacji?*
- Omawiając białko Derlin-1, Doktorantka pisze, że: „Derlin-1 jest związany m.in. z mechanizmami kontroli jakości białek, apoptozą wywołaną stresem ER oraz regulacją ubikwitynacji substratów systemu ERAD.” *Proszę o przedstawienie możliwego wyjaśnienia, jakie są powiązania między wymienionymi procesami.*
- Ponieważ w tekście doszło do pomyłek, m.in. w zapisie nazw mutantów drożdżowych, *proszę o podanie zasad nomenklatury genów, mutacji i białek przyjętych przez środowisko naukowe dla drożdży i człowieka.*

Rozdziały Materiały oraz Metody zostały przygotowane niezwykle skrupulatnie i starannie. Przejrzyście i detalicznie przedstawiono zastosowaną w pracy bogatą metodykę. Bardziej skomplikowane metody opatrzone kolorowymi schematami. Sposób opisanie metod w ocenianej rozprawie doktorskiej umożliwia samodzielne odtworzenie doświadczeń nawet osobie z małym doświadczeniem laboratoryjnym.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła rezultaty przeprowadzonych przez siebie badań, które doprowadziły do następujących wniosków:

- 1) W komórkach ludzkich linii HEK293, HeLa i HDFa oraz małych linii Vero występują dwie izoformy białka Sec61 α kodowane odpowiednio przez geny *SEC61A1* i *SEC61A2*, przy czym w komórkach ludzkich dominuje mRNA genu *SEC61A1*, podczas gdy w komórkach małych

dominuje mRNA genu *SEC61A2*. Poziomy białek poszczególnych izoform Sec61 α korelują z poziomami transkryptów.

- 2) Wyciszenie ekspresji genów *SEC61A1* i *SEC61A2* nie wpływa znacząco na żywotność komórek żadnej z analizowanych linii komórkowych, jednak odmiennie wpływa na retrotranslokację RTA z ER do cytozolu; w komórkach ludzkich linii HEK293 nie wpływa na transport RTA, w komórkach małpich linii Vero obniża retrotranslokację RTA z ER do cytozolu.
- 3) W komórkach ludzkich linii HEK293, wyciszenie ekspresji genu *SEC61A1* skutkuje spadkiem poziomu mRNA *SEC61A2* oraz wzrostem ekspresji genów kodujących białka z rodziny Derlin (Derlin1-3).
- 4) Nadprodukcja Derlin-3, ale nie nadprodukcja Derlin-1 czy Derlin-2, prowadzi do obniżenia liczby cząsteczek RTA uwalnianych z ER do cytozolu w komórkach ludzkich linii HEK293.

Należy podkreślić, że Pani mgr Natalia Sowa-Rogocińska przeprowadziła w swojej pracy bardzo dokładną krytyczną analizę przydatności metod stosowanych podczas wykonywania badań, z zaznaczeniem wszelkich słabych punktów aplikowanej metodologii. Z tekstu rozprawy wynika, że eksperymenty przeprowadzane były w sposób świadomy i przemyślany. Doświadczenia zostały zaprojektowane z wykorzystaniem odpowiednio dobranej metodyki, w sposób statystycznie poprawny, z liczbą niezależnych powtórzeń biologicznych pozwalających na uzyskanie wiarygodnych wyników.

Poniżej kilka uwag i pytań dotyczących tej części rozprawy:

- Rys. 18 jest praktycznie nieczytelny.
- Rys. 19 – podpis osi Y brzmi: „Względny poziom żywotności (% kontroli)”. Powinno być raczej „Przeżywalność komórek względem kontroli (%)” albo „Względna przeżywalność komórek (%)”. Podobną uwagę można zastosować do Rys. 20, 21, 34 i 35.
- Rys. 24 – Błędne podpisy osi. Powinno być: oś Y: Względny poziom mRNA *SEC61A2*; oś X: esiEGFP i esiSec61A1
- Rys. 26 - Błędne podpisy osi.
A) Powinno być: oś Y: Względny poziom mRNA *DERL1*; oś X: esiEGFP i esiSec61A1 + esiSec61A2
B) Powinno być: oś Y: Względny poziom mRNA *DERL2*; oś X: esiEGFP i esiSec61A1 + esiSec61A2
C) Powinno być: oś Y: Względny poziom mRNA *DERL3*; oś X: esiEGFP i esiSec61A1 + esiSec61A2
- Rys. 34 – Na rysunku podpis - Vero, w podpisie - HEK293. Której z linii komórkowych dotyczy ten wynik?
- Doktorantka wykazała, że wyciszenie genów kodujących izoformy białka Sec61 α nie wpływa na transport rycyny z ER do cytozolu, choć powoduje wzrost ekspresji genów kodujących białka z rodziny Derlin. *Skąd zatem przekonanie o potrzebie przeprowadzenia eksperymentu z*

nadprodukcją białek z rodziny Derlin? Jakie inne przesłanki przemawiały za tym by przetestować wpływ nadekspresji genów kodujących białka z rodziny Derlin na transport RTA z ER do cytozolu?

- *Skąd zdaniem Doktorantki biorą się różnice w żywotności analizowanych komórek, widoczne w testach wykorzystujących inne sposoby pomiaru przeżywalności, np. barwienie błękitem trypanu, testy MTT czy z wykorzystaniem analizatora komórek Muse (patrz Rys. 34 versus 35, albo Rys. 19, 20 i 21)?*
- *Na wielu rysunkach obrazujących wyniki analizy białek metodą western blot widoczne są albo bardzo słabe albo wysyczone sygnały (np., Rys. 23 A, B, Rys. 25 A, B, Rys. 36 B). Czy analiza densytometryczna takich blotów może dać wiarygodne rezultaty? Jak Doktorantka tłumaczy fakt, że na niektórych z blotów sygnały kalretikuliny dają pojedyncze prążki, a na innych podwójne (np., Rys. 36 B vs Rys. 37 B)?*
- *Jakie ograniczenia niesie ze sobą metoda określania wydajności transfekcji przy użyciu kotransfekcji wektorem niosącym gen kodujący białko zielonej fluorescencji?*

W Dyskusji Pani mgr Natalia Sowa-Rogozieńska komentuje uzyskane wyniki na tle literatury przedmiotu, wykazując, że porusza się w tej dziedzinie dosyć swobodnie. Raz jeszcze dyskutuje blaski i cienie zastosowanych w pracy metod i określa stopień zaufania do uzyskanych dzięki nim rezultatów. Doktorantka kładzie nacisk na planowanie i prowadzenie badań, w sposób, który umożliwiłby uniknąć artefaktów, pozwolił na odróżnienie skutków ubocznych zastosowanej metody od rzeczywistych rezultatów eksperymentu. Jest to wyraz dojrzałości naukowej.

O wysokim poziomie przygotowania Pani mgr Natalii Sowy-Rogozieńskiej do pracy badawczej świadczy detaliczność przedstawionych procedur eksperymentalnych, uzyskane wyniki i sposób krytycznego komentowania uzyskanych danych. Na szczególną uwagę zasługuje bogactwo, zastosowanych w pracy i optymalizowanych na jej potrzeby, metod eksperymentalnych. Swobodny sposób przedstawiania zagadnień związanych z tematyką badawczą oraz sposób prowadzenia dyskusji otrzymanych wyników potwierdza wysoki poziom pracy naukowej Doktorantki, a także świadczy o wysokiej jakości środowiska naukowego w którym ten doktorat był tworzony. Na korzyść Doktorantki przemawia również jej aktywne uczestnictwo w realizowanych na uczelni projektach badawczych NCN i POIR, jak również kierowanie własnymi projektami finansowanymi w ramach Konkursu Projektów Badawczych Młodych Naukowców na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Ponadto, Doktorantka aktywnie przedstawiała wyniki swoich badań podczas siedmiu konferencji naukowych, krajowych i międzynarodowych.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Sowy-Rogozieńskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka opanowała wiele technik laboratoryjnych, wykazała zdolność do krytycznego osądu otrzymanych przez siebie wyników oraz umiejętność stawiania nowych pytań, jest przygotowana do preparowania tekstów naukowych (rozprawa doktorska, wnioski grantowe, publikacje naukowe). Przejawia zatem umiejętności i zdolności predysponujące ją do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Doktorantka wykazuje również wiedzę ogólną w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne. Jest również współautorką kilku publikacji naukowych. Tym samym, zostały spełnione wszelkie wymagania stawiane Kandydatom i zawarte

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. z 2003 r. 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.). Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Sowy-Rogosińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

Z poważaniem,



Adrianna Skoneczna

**Aneks do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Sowy-Rogozńskiej, zatytułowanej
„Rola kanałów błonowych retikulum endoplazmatycznego (ER) w transporcie rycyny z ER
do cytozolu”**

Uwagi redakcyjne dotyczące przedstawionej do oceny pracy:

- 1) W rozprawie doktorskiej Doktorantka zbyt często używa określenia „ilość”, w kontekstach, w których powinna go unikać, np., pisząc o poziomie białek, zmianach w ekspresji genów, spadku/wzroście liczby transkryptów danego genu, liczbie przeżywających komórek, liczbie transportowanych cząsteczek RTA, etc. Ponieważ przedstawiane dane Doktorantka uzyskała na podstawie pomiarów, błędem jest używanie słowa „ilość”, określenia odnoszącego się do zjawisk niepoliczalnych, w podanych kontekstach („ilość białka”, „ilość transkryptu”, „ilość cząsteczek RTA”, itp.).
- 2) Należałoby zamiast określić „u komórek” czy „u *Escherichia coli*”, stosować odpowiednio „w komórkach” czy „w komórkach *Escherichia coli*”.
- 3) Mówimy o sekwencjach „konserwowanych” ewolucyjnie, a nie „konserwatywnych”.
- 4) W tekście dysertacji stosowany jest wielokrotnie skrót myślowy będący niestety błędem merytorycznym. Doktorantka stosuje określenie „transkrypt izoformy białka” zamiast „transkrypt genu kodującego izoformę białka” lub „mRNA genu kodującego izoformę białka”.
- 5) Doktorantka pisze, że wiązanie kompleksu Cdc48 z ubikwitynowanymi substratami ułatwia ich późniejszą ekstrakcję z błony. Powinno tu być raczej użyte określenie „uwolnienie” z błony, a nie „ekstrakcja”. Termin „ekstrakcja” używany jest w kontekście doświadczeń *in vitro*.
- 6) Doktorantka pisze, że „Derlin-2 oddziałuje z Derlin-1, VIMP, OS9, Ubc6e czy EDEM1. Charakter tych oddziaływań wskazuje na rolę Derlin-2 w procesie ERAD.” Jaki mianowicie jest „charakter” tych oddziaływań, że na to wskazuje?
- 7) Niekiedy Doktorantka zastosowała niefortunny dobór słów lub skróty myślowe, wiodące czytelnika na manowce, np.:
 - „nadprodukcja dominujących negatywnych mutantów Derlin-1 oraz Derlin-2 w komórkach HeLa nie wpływa na transport rycyny do cytozolu”,
 - „mysz z nokautem”,
 - „PDI, która katalizuje proces rozfałdowywania”,
 - „aktywność siRNA wyciszających ekspresję genów izoform 1 i 2 białka Sec61 α ”,
 - „Badania na drożdżach dowiodły, że mutacja Sec61 Δ wpływa na zahamowanie degradacji”
- 8) Str. 105: Doktorantka pisze: „komórki <...> wykazywały przeżywalność na poziomie 94% w porównaniu do komórek z prawidłowym poziomem ekspresji genów kodujących izoformy białka Sec61 α .”

Powinno być: „natywnym poziomem ekspresji” lub „poziomem ekspresji genów obserwowanych w komórkach kontrolnych”.

9) Str. 107: Doktorantka pisze: „wykazywały 70% żywotność w stosunku do komórek z endogenną ilością białka”

Powinno być: „wykazywały spadek żywotności o 30% w stosunku do komórek z natywnym poziomem białka”

10) Str. 112: Doktorantka pisze: „dochodzi do ok. 60-procentowego obniżenia ilości transkryptu genu”

Powinno być: „dochodzi do obniżenia o ok. 60% poziomu mRNA genu”

11) Brak jednolitego nazewnictwa tych samych cząsteczek w obrębie dysertacji. Przykładem może tu być nazewnictwo esiRNA. Autorka używa wymiennie form esiSec61A1 i esiA1, jak również esiSec61A2 i esiA2.

Sloniewski