

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Emilii Reszczyńskiej

pt. „Badanie oddziaływania białek wiążących barwniki karotenoidowe z błonami lipidowymi w układach modelowych”

Karotenoidy to żółto-pomarańczowe barwniki pochodzenia głównie roślinnego, pełniące w świecie roślin i zwierząt różnorodne ważne biologiczne funkcje. Dzięki silnym własnościom absorpcyjnym w zakresie światła niebieskiego, pełnią rolę barwników antenowych u organizmów fotosyntetyzujących, gdzie także chronią aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Rola ochronna tych barwników nie jest ograniczona do organizmów roślinnych. Ich zdolność gaszenia wzbudzonych stanów trypletowych oraz tlenu singletowego, a także zmiatania wolnych rodników wykorzystywana jest powszechnie. Szczególnie istotna wydaje się być ich ochronna rola w siatkówce oka, gdzie dwa dostępne w diecie karotenoidy - ksantofile luteina i zeaksantyna, gromadzone są w wyjątkowo wysokich stężeniach. Przypuszcza się, że ich obecność w centralnej części siatkówki oka ludzkiego – plamce żółtej (*macula lutea*) zapobiega rozwojowi związanej z wiekiem degeneracji plamki żółtej, czyli AMD. Nie wiadomo jednak do końca, jaka jest dokładna lokalizacja tych karotenoidów w komórkach siatkówki. Trwa dyskusja na temat, czy, jako związki o charakterze hydrofobowym, zlokalizowane są one bezpośrednio w lipidowej części błon komórkowych, czy też związane są ze specyficznymi białkami w postaci kompleksów. Z siatkówki oka wyizolowano kompleksy zeaksantyny z białkiem GST (S-transferaza glutationowa), a dokładnie z jego izoformą Pi. Nie wiadomo jednak, czy GST jedynie transportuje zeaksantynę do komórek siatkówki, czy też kompleks GST-zeaksantyna pozostaje w niezmienionej postaci w błonie komórkowej pełniąc tam funkcje ochronne. Intrygujące jest też to, że spośród wielu karotenoidów obecnych w diecie, a następnie transportowanych we krwi, tylko dwa – ksantofile luteina i zeaksantyna docierają do siatkówki.

Właśnie tym ciekawym i ważnym zagadnieniom poświęcona jest praca doktorska mgr Emilii Reszczyńskiej, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Gruszeckiego w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki UMCS oraz w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biologii i Biochemii UMCS. W pracy Doktorantka podjęła badania nad oddziaływaniami trzech karotenoidów: β -karotenu, luteiny oraz zeaksantyny z dwoma białkami – GST i albuminą wołową (BSA), typowym białkiem transportowym, a następnie nad oddziaływaniem powstałych kompleksów karotenoidowo-białkowych z błonami lipidowymi. W punkcie omawiającym szczegółowe cele pracy zawarto również informację o zastosowanych w pracy

technikach. Organizacja molekularna kompleksów karotenoidowo-białkowych badana była z zastosowaniem technik spektroskopowych: absorpcji UV-Vis, FTIR i dichroizmu kołowego (CD), a oddziaływanie tych kompleksów z błonami lipidowymi i ich wbudowywanie się do błon technikami monowarstw Langumir-Blodgett'a i FTIR oraz BLM.

Praca doktorska mgr Reszczyńskiej ma formę typowej rozprawy, liczy 95 stron maszynopisu, zawiera 49 rysunków i 4 tabele. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 91 pozycji. Większość przedstawionych w rozprawie wyników znalazła się w pracy „Carotenoid binding to proteins. Modeling pigment transport to lipid membranes”, opublikowanej w 2015 roku w czasopiśmie *Arch Biochem Biophys*, gdzie Doktorantka jest pierwszą autorką. Opublikowanie wyników w poczytnym biofizycznym czasopiśmie naukowym niewątpliwie świadczy o ważności tych wyników, a bycie pierwszym autorem o istotnym wkładzie Doktorantki w ich uzyskanie i interpretację. Rozprawa podzielona jest na 8 rozdziałów: trzy pierwsze zajmujące 31 stron tworzą wstęp teoretyczny stanowiący wprowadzenie w tematykę pracy i uzasadniający jej podjęcie. Rozdział 1 pt: „Białka” jest wg mnie napisany trochę chaotycznie. Bardzo ogólne i wręcz książkowe informacje na temat białek mieszają się ze szczegółowymi, ale wybiórczo potraktowanymi opisami białek GST i BSA. Niektóre fragmenty sprawiają wrażenie niepołączonych ze sobą ani niestanowiących logicznej całości, co utrudnia odbiór tekstu. Odnieść można wrażenie, że zostały nie do końca poprawnie przetłumaczone na język polski, w niektórych zdaniach brakuje orzeczenia albo zdania pozostają niedokończone. Mam też pewne zastrzeżenia co do strony formalnej, np. brakuje punktu 1.1 a od razu pojawia się punkt 1.2, czy też wg. spisu treści rozdział ten powinien pojawić się na stronie 11, a jest na 12. Zamiast „ilość” w odniesieniu do struktur białkowych powinno się użyć słowa „liczba”, zamiast „plazma” – polskiego słowa „osocze”, a zamiast „serum” – „surowica” itp. Na stronie 17 znalazło się kilka niejasnych lub niepoprawnych sformułowań, np.: „...katalizowania zredukowanego glutationu..”, „ludzie posiadający taki genotyp”, gdzie wcześniej mowa o populacji gryzoni, itp. Przy tych szczegółowych informacjach o białku GST brakuje nawiązania do kluczowego dla pracy zagadnienia oddziaływania GST z karotenoidami i możliwych tego oddziaływania konsekwencji. Rozdział 2, nawiasem mówiąc z omyłkowo nadanym numerem 1, poświęcony jest karotenoidom. W rozdziale tym omówiono m.in. kompleksy tworzone przez karotenoidy z różnymi białkami, ze szczególnym uwzględnieniem białka GST. Ten rozdział napisany jest lepiej, choć i tu Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów. Rysunek 14 przedstawia np. schemat całego pręcika, a nie tylko jego zewnętrznego segmentu, jak sugeruje podpis. Suplementacja luteiny (str. 35) dotyczy całego organizmu, a nie poszczególnych komórek (soczewki). Fagocytowane przez komórki RPE są złączające się dyski zewnętrznych segmentów fotorceptorów a nie ich „czubki”. Ostatni rozdział części teoretycznej zatytułowany jest „Błony biologiczne”, ale w rzeczywistości tylko początek tego rozdziału opisuje budowę i podstawową barierową funkcję błon. Większość rozdziału poświęcona jest modelom błony, stąd tytuł nie odzwierciedla w pełni treści rozdziału. Ponieważ jednym z celów pracy było zbadanie oddziaływania kompleksów karotenoidowo-białkowych z błonami lipidowymi, podrozdział „Organizacja karotenoidów w błonach lipidowych” powinien być zdecydowanie dłuższy. Z uwagi na nieco różną budowę chemiczną trzy badane przez Doktorantkę karotenoidy różnie lokują się w błonach, różnie też

wpływają na własności błon. W kontekście działania ochronnego, jak i tworzenia potencjalnych kompleksów z białkami, ich różna lokalizacja w błonie może mieć znaczenie.

Opis materiałów i metod stosowanych przez Doktorantkę, choć niezbyt obszerny, bo zajmujący 11 stron, zawiera najważniejsze informacje umożliwiające w większości przypadków odtworzenie stosowanych procedur i warunków doświadczalnych. W pracy zastosowano zarówno podstawowe (spektroskopia UV-Vis), jak i bardziej zaawansowane (FTIR-ATR czy rezonansowa spektroskopia Ramana) techniki biofizyczne. Nie do końca jasny jest dla mnie opis techniki tworzenia lipidowych warstw jednocząsteczkowych oraz ich monitorowania techniką FTIR-ATR. Zamieszczony na stronie 48 rysunek 21 obrazuje przykładową izotermę sprężania lipidu EYPC, a nie tworzenie warstwy monomolekularnej w waniencie teflonowej. Odnośnik do rysunku 21 powinien raczej znaleźć się w dalszej części tekstu, gdzie mowa jest o określaniu powierzchni lipidu. Niezbyt fortunnie sformułowano też podpis do Rysunku 23 „Schemat elektryczny pomiarów parametrów BLM”. W podrozdziale 6.6 brakuje mi określenia do jakich pomiarów przygotowywane były białka i kompleksy barwnikowo-białkowe. Brakuje też informacji, jakie było stężenie lipidu EYPC w sonikowanych liposomach. Z formalnego punktu widzenia Doktorantka popełniła kolejny błąd w numeracji podrozdziałów – w tekście znajdują się dwa nagłówki z numerami 6.5. Wynika to zapewne stąd, że do tekstu dopisano podrozdział „Rezonansowa spektroskopia Ramana..”, który zapomniano ująć w spisie treści.

Kolejną częścią rozprawy doktorskiej mgr Reszczyńskiej są Wyniki, zawierające również dyskusję. W moim odczuciu ta część rozprawy powinna być nieco dłuższa, zwłaszcza, gdy porównać ją z częścią teoretyczną, zajmującą dokładnie taką samą objętość. Zgodnie z postawionymi sobie celami, mgr Reszczyńska podzieliła uzyskane wyniki na dwie grupy – Badania organizacji molekularnej kompleksów karotenoidowo-białkowych (opisane w podrozdziale 7.1) oraz Badania oddziaływania kompleksów karotenoidowo-białkowych z błonami lipidowymi (podrozdział 7.2). Efekty oddziaływania karotenoidów z białkami obserwowane były niejako od dwóch stron: z jednej strony zmiany w widmach absorpcji oraz w widmach CD β -karotenu, luteiny i zeaksantyny pod wpływem białek GST i BSA wskazywały na istnienie oddziaływania między karotenoidami i białkami, z drugiej strony podobny wniosek można było wyciągnąć obserwując zmiany w widmach FTIR (pasma Amid I) badanych białek pod wpływem karotenoidów. Szczegółowa analiza widm pokazała, że β -karoten wiąże się z białkami w postaci głównie monomerycznej, natomiast luteina i zeaksantyna mogą wiązać się również niespecyficycznie z powierzchnią białek tworząc molekularne agregaty. Doktorantka poprawnie interpretuje widma w kontekście form monomerycznych i zagregowanych karotenoidów, poświęcając dużo uwagi również rodzajom powstałych agregatów. Píše, że formy zagregowane powstające w obecności białek mają istotne znaczenie w pełnieniu funkcji fotoprotekcyjnej dla ludzkiego oka, jednak nie wyjaśnia dlaczego. Wydaje się przecież, że formy zagregowane karotenoidów gorzej pełnią rolę antyutleniaczy niż formy monomeryczne choćby przez to, że słabiej wygaszają tlen singletowy. W tej pierwszej części brakuje też wytłumaczenia różnic pomiędzy wartościami absorbancji trzech różnych kompleksów karotenoidów z BSA. Na rys 25 widać wyraźnie, że wartości absorbancji β -karotenu związanego z BSA są dużo niższe niż pozostałych dwóch

karotenoidów. Może znaczenie dla wiązania karotenoidu z BSA ma brak w cząsteczce β -karotenu polarnych grup hydroksylowych? Z kolei widma absorpcji uzyskane dla kompleksów karotenoidów z GST (rys. 26) wskazują na słabsze oddziaływanie luteiny z tym białkiem w stosunku do pozostałych karotenoidów. Ten wynik też należałoby przedyskutować w kontekście różnic strukturalnych między tymi karotenoidami, uwzględniając obecność pierścienia ϵ w cząsteczce luteiny. W opisie wyników często brakuje odniesień do zamieszczonych rysunków, co utrudnia śledzenie toku eksperymentów, np. nie jest do końca jasne którego eksperymentu (i rysunku) dotyczy fragment tekstu na stronie 63. Podobnie jak w poprzednich rozdziałach, tu również Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów. Np. sformułowanie: „Widma dichroizmu kołowego nie wykazują aktywności optycznej” nie jest poprawne, bo aktywność optyczną mogą co najwyżej wykazywać związki chemiczne, a nie ich widma. Podobnie niezbyt zgrabne są sformułowania: „Próbki poddane wirowaniu nie usuwają form zasocjowanych cząsteczek..”, czy też „barwnik odwirowuje się w mniejszej ilości..”. W drugiej części rozdziału Wyniki opisano oddziaływanie białek i ich kompleksów z karotenoidami z błonami lipidowymi. Na podstawie zmian w widmach FTIR (Amid I) białek wnioskowano o stopniu i szybkości wbudowywania się białek i ich kompleksów z karotenoidami do dwuwarstwy lipidowej, z drugiej zaś strony, zmiany we własnościach elektrycznych błon lipidowych (obserwowane dzięki technice BLM) pod wpływem białek i ich kompleksów również wskazały na takie oddziaływanie. Na uwagę zasługuje elegancki eksperyment z zastosowaniem rezonansowej spektroskopii Ramana i ramanowskiego obrazowania mikroskopowego liposomów poddanych działaniu kompleksu zeaksantyna-GST. Zastosowanie lasera o długości fali wzbudzającej 457 nm pozwoliło obrazować jedynie te liposomy, które związały się z kompleksem, co potwierdziło bezpośrednio występowanie takiego oddziaływania. Oddziaływanie to nie podlega więc dyskusji, natomiast co do wniosku o modyfikacji strukturalnych własności błon przez kompleksy karotenoidowo-białkowe należałoby być bardziej ostrożnym. Badania pokazały jedynie, że zmieniają się własności elektryczne błon lipidowych (BLM), co świadczy o wbudowywaniu się w nie kompleksów. Bardzo prawdopodobne jest, że własności strukturalne ulegają przy tym zmianie, ale jednoznaczne stwierdzenie istnienia takiego efektu wymagałoby potwierdzenia przy wykorzystaniu innych technik stosowanych w badaniach strukturalnych własności błon. Bardzo ważnym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych badań jest pokazanie, że kompleksy karotenoidowo-białkowe mogą przenosić karotenoidy do fazy lipidowej błon, oraz, że agregaty karotenoidowe w ten sposób przeniesione mogą w tej fazie ulegać rozpuszczeniu. Podsumowując ten najważniejszy rozdział, uważam, że otrzymane przez mgr Reszczyńską wyniki przedstawiają istotną wartość naukową. Natomiast przydałaby się bardziej dogłębna ich interpretacja i szersza dyskusja w odniesieniu do literatury, np. w kontekście wybiórczej akumulacji zeaksantyny i luteiny w siatkówce.

Rozprawę kończą konkretnie sformułowane Wnioski oraz spis piśmiennictwa.

Pomimo wymienionych powyżej uwag krytycznych uważam, że praca doktorska pani mgr Emilii Reszczyńskiej wnosi istotne informacje na temat tworzenia kompleksów karotenoidów z białkami oraz oddziaływania tych kompleksów z błonami. Doktorantka zrealizowała zasadnicze cele pracy, a uzyskane przez nią wyniki mogą pomóc wyjaśnić

mechanizm transportu barwników karotenoidowych do komórek siatkówki oka, a także przyczynić się do lepszego zrozumienia ich ochronnej roli. Wart podkreślenia jest również fakt, że Pani Reszczyńska, będąc doktorantką na kierunku Biologia, podjęła się realizacji ważnego biologicznie tematu z użyciem specjalistycznych technik biofizycznych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Emilii Reszczyńskiej spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich z biologii oraz wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS o dopuszczenie mgr Emilii Reszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 23.08.2016



Dr hab. Anna Wiśniewska-Becker