



Warszawa 05.08.2016

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Emilii Reszczyńskiej

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

Naukowe znaczenie tematyki badawczej i cel rozprawy

Badania podstawowe często mają odniesienie do praktyki, czy to w medycynie czy w biotechnologii. I tak jest tym razem. Poznanie oddziaływań molekularnych między białkami, karotenoidami i błonami lipidowymi może wyjaśnić drogę transportu karotenoidów z fazy wodnej do fazy lipidowej. Określenie tych zależności jest kluczowe dla określenia mechanizmów transportu karotenoidów do błon komórkowych, w szczególności do komórek siatkówki oka, gdzie ich zawartość jest bardzo wysoka. Rozszerzenie wiedzy podstawowej o biofizycznych procesach transportu karotenoidów może z czasem okazać się przydatne w leczeniu schorzeń siatkówki oka takich jak starcze zwyrodnienie plamki żółtej.

Uwagi ogólne

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki WMFiI i w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biologii i Biochemii WBiB UMCS pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława I. Gruszeckiego. Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki prowadzi długoletnie badania nad własnościami układów wiążących karotenoidy, a zgromadzony dorobek naukowy i doświadczenie badawcze w tej dziedzinie jest ogromne. Praca była realizowana w ramach projektu TEAM pt.: „Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies” finansowanego przez FNP.

Praca doktorska ma formę klasyczną, z podziałem na typowe dla prac eksperymentalnych rozdziały. Rozprawę rozpoczyna streszczenie oraz nieco niepełny wykaz skrótów. Wstęp liczy 30 stron maszynopisu w tym 19 rysunków. Zagadnienia metodyczne udało się opisać Autorce na 10 stronach posiłkując się 5 rysunkami. Wyniki badań zostały przedstawione w liczącym 30 stron rozdziale „Wyniki i badań i dyskusja” zawierającym 24 rysunki i 4 tabele. Cel badań i wnioski badań zajmują po jednej stronie maszynopisu. Doktorantka zacytowała 91 pozycji literatury, prezentujących szeroki zakres tematów dotyczących struktury, biodostępności, występowania i znaczenia karotenoidów a także budowy badanych białek, siatkówki oka oraz zagadnień metodycznych.

Wszystkie wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej weszły w skład publikacji w Archives of Biochemistry and Biophysics 584 (2015)125-133, gdzie Doktorantka jest pierwszym z pięciu autorów a promotor autorem korespondencyjnym.

Strona edytorska pracy, m.in. graficzne przedstawienie wyników jest staranne. Rysunki wmontowane są w tekst, co ładnie wygląda, powoduje jednak, że niektóre zestawienia rysunków są zbyt małe co utrudnia ich analizę. Dane ilościowe są dokładnie opracowane statystycznie, natomiast przy wynikach reprezentatywnych nie zawsze wiadomo ile wykonano powtórzeń danego eksperymentu. Opisy wyników nie zawsze, zdaniem recenzenta, są jasno uporządkowane, co utrudnia ich interpretację.

Uwagi szczegółowe

Pracę rozpoczyna duży, i zróżnicowany tematycznie *Wstęp*. Autorka przedstawia na początku budowę molekularną transferazy glutationowej (GST) oraz albuminy z surowicy wołowej (BSA), białek będących przedmiotem badań. Omawia strukturę drugo-, trzecio- i czwartorzędową oraz dość ogólnie ich własności biologiczne. W tej części wstępu wyraźnie zabrakło mi dokładniejszego omówienia reakcji katalizowanej przez GST. W związku z celem pracy przydałby się wydzielony podrozdział analizujący strukturę GST i BSA pod kątem możliwości przyłączenia karotenoidów, szczególnie że znane są modele molekularne badanych białek i motywy wiążący w białku OCP (orange carotenoid protein). Autorka nieco poruszyła kwestie oddziaływań GST ze związkami drobnocząsteczkowymi, ale odniosła to tylko do wiązania glutationu, a wiadomo, że ten enzym może wiązać szereg związków nie będących jego substratami. Szkoda także, że Autorka nie omówiła własności BSA czy HSA (albuminy ludzkiej) w wiązaniu cząsteczek hydrofobowych, co można by odnosić do wiązania karotenoidów. Byłby to ciekawy element pracy, chociaż teoretyczny, ale dający wyobrażenie o interakcjach karotenoidów z białkami na poziomie molekularnym.

W dalszej części wstępu Autorka charakteryzuje karotenoidy, głównie pod względem ich własności spektralnych, występowania oraz w szczególności roli luteiny i zeaksantyny w siatkówce oka. Ciekawym fragmentem wstępu jest rozdział omawiający drogę karotenoidów z przewodu pokarmowego do krwi, przestrzeni międzykomórkowej i docelowo do wnętrza komórek. Dokładniej przedstawiono oddziaływania karotenoidów z lipidami, tworzenie miceli w przewodzie pokarmowym i prawdopodobny mechanizm transportu przez błonę cytoplazmatyczną.

Dwa kolejne rozdziały mające omówić kompleksy barwnikowo-białkowe w zasadzie odnoszą się do białka GSTP1 (izoformy π GST) i albuminy. Brakuje mi w tym miejscu omówienia także innych białek wiążących i przenoszących karotenoidy, byłby to dowód na powszechność tego zjawiska. Kontynuacją rozdziałów o kompleksach białkowo-karotenoidowych jest opis budowy siatkówki oka w kontekście występowania w komórkach światłoczułych zeaksantyny i luteiny oraz opisanie roli karotenoidów w starczej degeneracji plamki żółtej. Wybór białka GSTP1, obecnego w siatkówce oka, jako przedmiotu badań wydaje się oczywisty. I prawdopodobnie dlatego Autorka dokładniej je charakteryzuje. Czy BSA, homolog albuminy ludzkiej (HSA), wybrano jako drugie białko przenoszące karotenoidy czy też, biorąc pod uwagę odmienną budowę jako układ porównawczy?

W następnych rozdziałach omówiono budowę dwuwarstwy lipidowej, organizację karotenoidów w środowisku lipidowym i polarnym oraz zasadę tworzenia sztucznych błon lipidowych. Zabrakło mi w tej części wspomnienia o teoriach włączaniu białek do dwuwarstwy lipidowej, co jest w dużej mierze przedmiotem badań Autorki.

Cel badań został przez Doktorantkę określony jasno, choć zdawkowo. Za to rozdziały poświęcone **Metodyce** są szczegółowe. Autorka omawia otrzymywanie barwników, zeaksantyny oraz luteiny, procedury ich oczyszczania oraz charakterystykę zakupionych β -karotenu, GSTP1 i BSA. Dokładnie omówiono metody spektroskopowe UV/Vis, FTIR, dichroizm kołowy i spektroskopię Ramana oraz metodykę otrzymywania i charakterystyki błon jednowarstwowych, dwuwarstwowych i liposomów a także schemat otrzymywania kompleksów białkowo-karotenoidowych i procedurę wbudowywania białek i kompleksów do błon. Według mnie podrozdział o analizie widm FTIR (str. 67) umieszczony w części „Wyniki badań i dyskusja”, lepiej pasowałby do części metodycznej. Metodyka opisana jest w taki sposób, że umożliwia dokładne powtórzenie eksperymentów.

Autorka przedstawiła uzyskane w czasie wykonywania pracy wyniki wspólnie z ich dyskusją w rozdziale **Wyniki badań i dyskusja**. Spowodowało to powstanie szeregu krótkich rozdziałów podzielonych głównie według stosowanych układów doświadczalnych badanych przy zastosowaniu dobranej odpowiednio metodyki. Układ ten jest zbieżny z publikacją w ABB i podobnie jak w publikacji, każdy zestaw wyników zakończony jest krótkim podsumowaniem, a ostateczne wnioski są w wypunktowane w ostatnim rozdziale.

Autorka starała się rozwiązać trzy zagadnienia badawcze (i) formę wiązania karotenoidów z białkami, (ii) wpływ związania karotenoidów na strukturę białek, (iii) oddziaływania kompleksów białko-karotenoid z błoną lipidową – określenie mechanizmu udziału badanych białek w przenoszeniu karotenoidów do błony lipidowej.

(i) Autorka stwierdziła istnienie różnic między wiązaniem przez białka β -karotenu a luteiny i zeaksantyny. W roztworze β -karoten wiąże się z białkami w formie monomerycznej, a luteina i zeaksantyna tworzą formy zagregowane typu H (card-pack) i J (head to tail). Jednak wydaje się, że i luteina i zeaksantyna silniej związane z powierzchnią białka tworzą H-agregaty i prawdopodobnie również formy monomeryczne. Czy można w tym przypadku mówić, podobnie jak dla lipidów acylowych, o otoczce białka (*annulus*) z silniej i słabiej związanymi karotenoidami?

Doktorantka stwierdziła także różnice w wiązaniu karotenoidów, szczególnie zeaksantyny, przez BSA i GST. Czy da się wytłumaczyć te obserwacje inną trzecio- i czwartorzędową strukturą tych białek?

(ii) Wyniki uzyskane metodą IR wskazują na pojawienie się form zagregowanych BSA w obecności β -karotenu, za to zeaksantyna wydaje się indukować zmiany w strukturze trzeciorzędowej BSA i GST. Czy można te różnice wiązać z różnicą polarności tych karotenoidów?

(iii) Autorka określiła kinetykę wbudowywania białek i kompleksów białkowo-karotenoidowych do błon lipidowych i wykazała, że do błon wbudowują się zarówno same białka jak i kompleksy białkowo-karotenoidowe. Pomiar widm absorbancji, widm Ramana oraz pomiar oporu właściwego błon jednoznacznie wskazuje że agregaty karotenoidowe związane z białkami przechodzą w błonie do fazy lipidowej, przyjmując charakterystyczne w tej fazie położenie molekularne. Także nieznacznie zmienia się konformacja białek po ich inkorporacji do błony. Czy miałyby tutaj następować zamiana otoczki „karotenoidowej” na „lipidową”?

Przeprowadzone doświadczenia mogą służyć na dowód istotnej roli BSA i GST w przenoszeniu karotenoidów z fazy wodnej do fazy lipidowej. Mechanizm ten może mieć miejsce w komórkach cechujących się dużą zawartością karotenoidów w błonach, tak jak w przypadku zewnętrznego segmentu (ROS) komórek światłoczułych siatkówki oka.

Wniosek końcowy:

Oceniając rozprawę doktorską Pani mgr Emilli Reszczyńskiej pragnę stwierdzić, że zarówno poziom uzyskanych danych eksperymentalnych, sposób ich wykonania jak i ich znaczenie poznawcze zasługują na wysoką ocenę. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poznanie oddziaływań białka-karotenoidy jak i mechanizmów związanych z transportem karotenoidów poprzez fazę wodną do błon lipidowych. Wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w uznanym czasopiśmie, czyli poddane wnikliwej recenzji przez specjalistów zajmujących się podobną co Doktorantka tematyką. Moje uwagi dotyczą pewnych elementów wprowadzenia do tematu i dyskusji wyników ale nie wpływają istotnie na ocenę pracy. Niektóre uwagi są pytaniami rozpoczynającymi dyskusję i pewnie wykraczającymi poza zakres rozprawy doktorskiej. Doktorantka jest ponadto współautorką trzech innych publikacji, których wyniki nie są związane z tematem pracy doktorskiej, choć jedna praca jest metodycznie ściśle związana z doświadczeniami prezentowanymi w rozprawie.

Praca doktorska Pani mgr Emilii Reszczyńskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka wykazała się sporymi umiejętnościami praktycznymi, szczególnie opracowując i realizując trudne doświadczenia związane z formowaniem błon lipidowych i badaniem inkorporacji białek i kompleksów białkowo-karotenoidowych. Zachowała także spory krytycyzm w stosunku do otrzymanych wyników nie formułując za daleko idących hipotez.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS o dopuszczenie Pani mgr Emilii Reszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Maciej Garstka