



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Kamilla Bąkowska-Żywicka, prof. ICHB PAN

Poznań, 11.04.2018 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Kamila Deryło pt.:

„Rybosomalne centrum GTPazowe jako element adaptacji komórki do warunków stresowych”

I. Ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr Kamila Deryło powstała w Zakładzie Biologii Molekularnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Marek Tchórzewski a promotorem pomocniczym dr Barbara Michalec-Wawiórka. Praca ta wpisuje się w tematykę badawczą zespołu, który ma znaczące osiągnięcia w badaniach struktury i funkcji rybosomowych białek tworzących kciuk rybosomalny. Praca ma postać klasycznej dysertacji.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy rybosomowego centrum GTPazowego (GAC), a mówiąc precyzyjniej poznania roli białek formujących strukturę GAC w procesie adaptacji komórek do warunków stresu jąderkowego. Magister Kamil Deryło skupił się na roli białek Mrt4, uL10, P1 i P2, wykorzystując w swoich badaniach niezwykle precyzyjne analizy lokalizacji subkomórkowej tych białek w pojedynczych komórkach (a więc w układzie *in vivo*) a także analizy biochemiczne, przeprowadzane *in vitro*. Chociaż od dawna znamy strukturę rybosomu a także mechanizm przeprowadzanej przez rybosom biosyntezy polipeptydów, jesteśmy jeszcze bardzo daleko od zrozumienia molekularnych detali regulacji tego procesu, zwłaszcza w organizmach eukariotycznych. Piszę o tym aby podkreślić, że tematyka wybrana przez Doktoranta i jego Promotora jest w pełni oryginalna a zaplanowane i wykonane przez mgr Kamila Deryło doświadczenia odpowiadają na ważne biologiczne pytania.

Celem ocenianej rozprawy było zbadanie roli GAC w adaptacji metabolizmu komórki do warunków stresowych zarówno na poziomie biogenezy rybosomów jak i dojrzałych, aktywnych translacyjnie



ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03 sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32 e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
<http://www.ibch.poznan.pl>



rybosomów. Oba cele badawcze uważam za bardzo ambitne, a uzyskane przez Doktoranta wyniki są w pełni oryginalne i bardzo ciekawe. Spełniony został zatem wymóg nowatorstwa badań zaprezentowanych jako rozprawa doktorska. Z punktu widzenia tematyki, wyboru obiektu badań oraz postawionego problemu badawczego oceniana rozprawa nie budzi żadnych zastrzeżeń. Wartość naukową pracy najlepiej obrazuje fakt, że uzyskane przez mgr Kamila Deryło wyniki zostały już opublikowane w dwóch artykułach, które ukazały się w znanych czasopismach naukowych, w *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* oraz *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Kamila Deryło w pełni spełnia warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim, zarówno pod względem formy jak i oryginalności tematu a także poziomu naukowego przedstawionych w niej wyników.

II. Ocena merytoryczna

Układ rozprawy jest bardzo przejrzysty, a lekturę ułatwiają bardzo dobrze przygotowane ryciny zawarte w części opisującej uzyskane wyniki. Dodatkowo, zaprezentowane schematy w świetny i dobry do zapamiętania sposób pokazują stosowane metody. Wykonanie takiego schematu jest prawdopodobnie dość proste a znacznie ułatwia późniejszą analizę wyników.

Wszystkie opisane w rozprawie wyniki naukowe zostały bardzo wnikliwie skonfrontowane z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych badaczy. Ta polemika z danymi uzyskanymi przez innych oparta jest na dobrze dobranej literaturze naukowej i wskazuje, że mgr Kamil Deryło znakomicie zna literaturę naukową poświęconą tematyce pracy. Dobrą i gruntowną znajomość literatury dostrzegłam także podczas czytania części wstępnej rozprawy, która doskonale wprowadziła mnie w tematykę. Rozprawę mgr Kamila Deryło kończy krótki rozdział, w którym podsumowuje on uzyskane przez siebie wyniki oraz przedstawia opracowany model adaptacji metabolicznej rybosomalnego centrum GTPazowego w stresie jąderkowym.

Wszystkie przedstawione w rozprawie wyniki naukowe uzyskane przez mgr Kamila Deryło są niezwykle interesujące i w pełni oryginalne. Już sam fakt ich opublikowania w dobrych czasopismach naukowych, świadczy o dużej wartości naukowej ocenianych wyników. W obu przypadkach prace przeszły najprawdopodobniej kilka rund ostrej krytyki ze strony wymagających recenzentów, a to co trafiło do mojej oceny zostało już przez Autora zapewne gruntownie poprawione. Zatem moja rola oceniającego jest nieco ułatwiona. Niemniej chciałabym się odnieść do kilku spraw, jakie nasunęły mi się podczas analizy pracy.

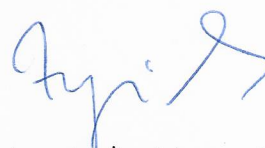
1. Podczas omawiania wyników dotyczących lokalizacji w komórce białek Mrt4 i jego wariantu delecyjnego, Mrt4₁₋₂₁₇ Autor powołuje się na „znaczną heterogenność tej subkomórkowej lokalizacji. W jaki sposób była ona obserwowana?
2. W efekcie obserwowanej heterogenności lokalizacji, Doktorant zdecydował się na przeprowadzenie analiz na „populacji 400 komórek w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych”. Czy zatem łącznie poddano analizie 1200 komórek? Ponadto, ze względu na toczącą się dyskusję w definiowaniu „powtórzenia biologicznego” przy analizie linii komórkowych, poproszę o komentarz i doprecyzowanie co stanowiło powtórzenie biologiczne: czy była to inna hodowla tej samej linii, czy hodowle prowadzone były równoległe czy w odstępie czasowym czy też zdecydowano użyć inną linię komórkową?
3. Badania lokalizacji wszystkich wariantów Mrt4 przeprowadzone na dużej liczbie komórek pozwoliły na analizę statystyczną wyników. Doktorant obserwował już w warunkach kontrolnych różnice w lokalizacji Mrt4 i Mrt4₁₋₂₁₇: forma natywna zlokalizowana jest niemal w całości w jąderku i cytoplazmie, natomiast forma delecyjna jedynie w 70% (pozostałe 30% wyłącznie w cytoplazmie). O ile różnice w lokalizacji tych form Mrt4 obserwowane w stresie wywołanym ActD są dobrze przedyskutowane, to nie znalazłam wyjaśnienia sytuacji obserwowanej w warunkach kontrolnych. Bardzo proszę o komentarz.
4. Przy analizach biochemicznych z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji typu western blot (tu dodatkowa uwaga edytorska: nie widzę potrzeby używania wielkich liter przy nazwie techniki) na rysunku 19 przedstawiono jedynie wyniki dla formy delecyjnej białka Mrt4. Są one bardzo przekonujące i dobrej jakości ale równoległe powinny zostać przeprowadzone takie same analizy dla natywnej formy białka. Powołanie się na wyniki innej pracy, ze względu na np. różnice techniczne w przeprowadzaniu eksperymentów, jest moim zdaniem niewystarczające. Poza tym, zakładam, że przedstawiono wynik reprezentatywny, będący odzwierciedleniem kilku przeprowadzonych eksperymentów, jednak tej informacji zabrakło w opisie rysunku czy też w rozdziale opisującym metodę.
5. Przy analizach FRAP-AC komórki poddawano ośmiogodzinnej inkubacji z ActD podając przy tym informację, że „ośmio-godzinna inkubacja z ActD nie jest toksyczna dla komórek HeLa, a usunięcie ActD z podłoża hodowlanego w pełni przywraca ich wzrost i podziały”. Czy to jest obserwacja własna czy też doniesienie literaturowe? Konieczny byłby w tym miejscu odpowiedni odnośnik do konkretnego źródła.
6. Analizy FRAP-AC prowadzono po pięciu godzinach od usunięcia ActD z podłoża. Jakie jest uzasadnienie wyboru takiego punktu czasowego?

7. Wyniki FRAP-AC wskazały jednoznacznie, że uwalnianie białka uL10 z rybosomu jest nieodwracalne, bez możliwości ponownej asocjacji z rybosomem. Jakie, Pana zdaniem, mogłoby być uzasadnienie tej sytuacji? Czy „stresowe rybosomy” pozbawione uL10 przyjmują inną strukturę kciuka? Czy też raczej chodzi o intensywne wykorzystanie uwolnionego białka do innych, pozarybosomowych celów? Poza tym, czy istnieją dane literaturowe mówiące o aktywności translacyjnej podczas stresu jąderkowego?
8. Bardzo podoba mi się zaproponowany model adaptacji metabolicznej centrum GTPazowego do stresu jąderkowego. Interesuje mnie Pana zdanie na temat tego, czy adaptacja GAC na niedojrzałych i dojrzałych rybosomach zachodzi równoległe w komórkach? I czy taki mechanizm odpowiedzi na stres nie jest zbyt drastyczny dla komórki: nie dość, że nowe rybosomy nie dojrzewają to dodatkowo dojrzałe ulegają deaktywacji.

Wszystkie przedstawione powyżej komentarze w najmniejszym stopniu nie mają na celu umniejszania wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Moje uwagi mają raczej charakter polemiczny i są podyktowane chęcią dyskusji.

III. Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr Kamila Deryło oceniam bardzo wysoko. Autor przedstawił w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe. Oceniana praca spełnia z nawiązką wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marie Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Kamila Deryło do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wyjątkowo wysoki poziom zaprezentowanych w rozprawie wyników oraz oryginalność podjętego tematu badawczego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kamila Deryło stosowną nagrodą.



dr hab. Kamilla Bąkowska-Żywicka, prof. ICHB PAN