UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Zoologii, Zakład Fizjologii Zwierząt
dr hab. Piotr Bębas

Warszawa, 7 kwietnia 2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. „Analiza funkcjonalna rybosomalnych białek-P na modelu *Saccharomyces cerevisiae*" autorstwa Pani mgr Elizy Molestak

Rozprawa doktorska została przygotowana pod opieką promotorską Pana Prof. dr. hab. Marka Tchórzewskiego i dr. Leszka Wawiórki (promotora pomocniczego) w Zakładzie Biologii Molekularnej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Głównym problemem poruszonym w dysertacji jest określenie funkcji jaką pełnią rybosomalne białka P lokalizujące się w centrum odpowiedzialnym za uwalnianie energii zawartej w wysokoenergetycznych wiązaniach GTP, która jest wykorzystywana w procesie translacji. Autorka zadała sobie również pytanie o znaczenie multiplikacji tych białek w rybosomie. Do badań wykorzystała modelowy organizm – drożdże *S. cerevisiae* dzikiego szczepu oraz mutanty z kompleksem białek P o zmienionej strukturze. Podjęcie się rozwiązania wspomnianych problemów badawczych uważam za ważne poznawczo zadanie naukowe, które można rozpatrywać także w kontekście pozyskiwania danych, istotnych z praktycznego punktu widzenia – dotyczących mechanizmu działania antybiotyków, potencjalnie użytecznych w leczeniu chorób wywoływanych przez grzyby.

Temat rozprawy doktorskiej jest zgodny z problematyką poruszoną w jej treści. Dysertacja ma strukturę typową dla prac, w których prezentowane i omawiane są wyniki badań eksperymentalnych. Każdy z rozdziałów zawiera właściwe mu informacje i jest przygotowany w profesjonalny sposób – niebudzący zastrzeżeń pod względem merytorycznym. Co ważne, w pracy zachowane zostały proporcje objętości i jakościowe między poszczególnymi częściami, a to pozwala wysoko ocenić nabytą przez Panią Magister umiejętność prezentowania wyników własnych badań. We „Wstępie" omówiła budowę rybosomu prokariotycznego i eukariotycznego, bliżej scharakteryzowała strukturę i funkcje centrum GTPazowego, prezentując szczegółowo jego udział w procesie translacji. Dalej przeprowadziła syntezę danych literaturowych o znaczeniu białek P dla funkcjonowania centrum GTPazowego oraz scharakteryzowała ich znaczenie w procesach, nie związanych z translacją. Wszystkie przedstawiane dane są poparte dobrze cytowaną literaturą naukową, w przeważającej części opublikowaną w ostatnich latach. Uwagę zwraca

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

krytyczne podejście do poruszanych problemów – Pani Magister precyzyjnie systematyzuje wiedzę podkreślając te aspekty, które są w pełni scharakteryzowane, ciągle badane i te, które wymagają poznania. Za ważne uważam prezentowanie danych o funkcji składowych rybosomu w szerokim ujęciu – nie tylko strukturalnym, czy dotyczącym roli związanej z translacją, ale także odnoszących się do zjawisk obserwowanych na poziomie komórki, czy całego organizmu. We „Wstępie" Autorka zamieściła dużą liczbę schematów (zaczerpniętych z cytowanych pozycji literaturowych), które ułatwiają zrozumienie opisów dotyczących szczegółowo charakteryzowanych struktur.

Mam także kilka uwag krytycznych w odniesieniu do rozdziału „Wstęp". Autorka posługuje się wielokrotnie pojęciem „domena życia" omawiając podobieństwa i różnice strukturalne rybosomów oraz ich składowych u organizmów reprezentujących różne grupy. Wystarczyłoby użyć pojęcia domeny, tak jak w przypadku nazw innych jednostek w systemie klasyfikacji organizmów – nie mówimy przecież o królestwie życia, typie życia, czy gromadzie życia. Zastrzeżenie o podobnym charakterze mam do powszechnie (niestety) stosowanego pojęcia „organizmy żywe" – jest to przykład tautologii, bo organizm jest w swej istocie żywy; jeśli coś nie jest żywe to nie może być określane jako organizm.
Poza tym, kilka informacji zawartych we „Wstępie" wymaga doprecyzowania i rozwinięcia. Na stronie 27 rozprawy Pani Magister pisze o pętli sarcynowo-rycynowej i jej roli w kontekście hydrolizy GTP, a pod koniec opisu wspomina o „aktywacji cząsteczki wody", która w konsekwencji „indukuje hydrolizę γ-fosforanu w cząsteczce GTP" – chciałbym spytać, co należy rozumieć pod pojęciem „aktywacja cząsteczki wody", czy chodzi po prostu o jej mobilizację i pozycjonowanie? Omawiając mechanizmy leżące u podstaw regulacji aktywności centrum GTPazowego Pani Magister zwraca uwagę na ważne zjawisko modyfikacji C-końca białek P, jednak swój wywód kończy dość ogólnym stwierdzeniem o tym, że modyfikacje te mogą być konsekwencją odpowiedzi komórki „na zmieniające się warunki środowiskowe". Proszę Panią Magister o rozwinięcie tego zagadnienia podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Moim zdaniem we „Wstępie" brakuje także pełnej charakterystyki antybiotyków, które Autorka wykorzystywała przy analizie funkcjonalnej translacji, a przede wszystkim omówienia ich wpływu na fizjologię komórki. Nie jest to uwaga krytyczna (szczególnie, że sporo danych o antybiotykach znajdziemy w rozdziale „Wyniki"), ale sugestia, że temat roli antybiotyków w regulacji funkcji rybosomów np. w kontekście ich wykorzystania, jako środków przeciwgrzybiczych, mógłby być bardziej zaakcentowany we wprowadzeniu do dysertacji, a potem szerzej omówiony podczas dyskusji uzyskanych wyników. Podrozdział, w którym Pani Magister omawia inne funkcje białek P, niż te związane z translacją, jest bardzo dobrze przygotowany i zawiera wiele cennych informacji, choć niektóre wydają mi się nazbyt ogólne, wziąwszy pod uwagę rangę dysertacji. Przykładem może być informacja o nadekspresji białka uL10 w komórkach nowotworowych, i tu, moim zdaniem, brakuje doprecyzowania o jakich typach nowotworów mowa, bo określenia nowotwory ginekologiczne, czy jelita grubego lub wątroby to pojęcia na tyle ogólne, że niewiele mówiące.

Cele badawcze przedstawione przed Panią Magister są jednoznaczne. Ich sformułowanie poprzedza krótki wywód o problemie, który można potraktować jako zbiór hipotez badawczych, do których weryfikacji miała doprowadzić realizacja tych celów. Autorka za ważne uznała wykonanie charakterystyk fenotypów

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

mutantów drożdży ze zmienionym kompleksem białek P, aby określić jaki efekt wywierają te modyfikacje w obrębie centrum GTPazowego na potencjał rozwojowy i żywotność komórek. Ponadto, postanowiła przeprowadzić analizy, których celem było ustalenie efektów jakie wywierają modyfikacje białek P na translację w kontekście regulacji ilościowej tego procesu. Uznała za istotne określenie znaczenia tych białek dla precyzji dekodowania informacji genetycznej w czasie translacji.

Każdy z wytyczonych celów został zrealizowany z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi badawczych, przy zachowaniu wysokich standardów, co moim zdaniem daje gwarancję, że wyniki prezentowane w dysertacji są wartościowe naukowo. Różnorodność metod eksperymentalnych, które Pani Magister wykorzystała podczas prowadzenia badań, jest imponująca. Co więcej, wiele z nich wymaga ogromnego doświadczenia i wiedzy z zakresu biologii molekularnej, a także precyzji oraz zdolności manualnych. A z tym, co łatwo zauważyć po analizie prezentowanych wyników, Pani Magister poradziła sobie doskonale. W moim przekonaniu podziw budzić może także wielowątkowe podejście do każdego problemu, a przy tym posługiwanie się różnymi narzędziami badawczymi do poszukiwania odpowiedzi na te same pytania, co tylko utwierdza mnie w przekonaniu, że wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej są bardzo cenne i pod względem jakości spełniające światowe standardy. Opis wykorzystanych metod badawczych nie jest ograniczony jedynie do rozdziału „Materiały i metody". Autorka prezentuje procedury i narzędzia badawcze także w rozdziale „Wyniki" – zabieg ten uważam za właściwy, bo zdecydowanie ułatwia lekturę rozprawy.

Mam dwie uwagi dotyczące procedur badawczych. Opis metody stosowanej do analizy powierzchni profili polisomów ogranicza się do informacji o użyciu stosownego oprogramowania i tego, że powierzchnię obliczano dla frakcji 40S, 60S i 80S oraz frakcji polisomalnych – tu spodziewałbym się szerszego opisu, szczególnie, że metoda ta nie została omówiona także w rozdziale „Wyniki" lub skrótowo pod rycinami z wykresami (a taki sposób prezentowania wyników Autorka stosowała w przypadku innych danych). Badania mające za cel charakterystykę fenotypu mutantów polegały między innymi na poddaniu komórek wpływowi czynników stresowych, takich jak szok osmotyczny, temperatura odbiegająca od optymalnej dla rozwoju oraz wysokie pH. Autorka jednak nie precyzuje dokładnie, których związków użyła do wywołania szoku osmotycznego (były to prawdopodobnie chlorki sodu i potasu oraz sorbitol – czego można się domyślać na podstawie danych z ryciny 19 i bardzo ogólnego opisu na stronie 37). Trudno wywnioskować na czym polegało wywołanie szoku temperaturowego oraz szoku pH.

Wyniki zaprezentowane w dysertacji są bardzo dobrze opracowane, a ich liczba imponująca. W pierwszej kolejności Pani Magister przeanalizowała fenotyp mutantów wykazując, że komórki szczepu pozbawionego wszystkich białek P mają zaburzony cykl komórkowy, a aberracja ta dotyczy fazy G1 cyklu. Mutacja ta ma także ewidentny wpływ na metabolizm drożdży, bo upośledza zdolność do wykorzystywania przez komórki niefermentowalnych źródeł węgla. Autorka postawiła tezę, że podłożem tych zmian są zaburzenia jakościowe, a nie ilościowe w mechanizmie translacyjnym. Wykazała bowiem, że brak białek P na rybosomie nie zmienia żadnego z etapów translacji i nie ma wpływu na dynamikę tego procesu. Udowodniła jednocześnie, że obecność białek P w rybosomach odgrywa kluczową rolę w precyzji odczytu

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

informacji genetycznej. Co więcej dowiodła, że istnieje korelacja między liczbą kopii białek P, a poziomem popełnianych przez rybosom błędów podczas odczytu informacji z mRNA – bowiem wzrost liczby brakujących dimerów skutkuje zwiększeniem liczby błędów popełnianych przez maszynerię translacyjną. Tym Pani Magister udowodniła, że multiplikacja białek P ma znaczenie dla precyzji z jaką rybosomy rekrutują właściwe aa-tRNA. Za bardzo ciekawy uważam wynik uzyskany przy badaniach, w których Autorka korzystała z konstruktów genetycznych i który wskazał na to, że nawet niewielka pula rybosomów w komórce, cechujących się brakiem białek P wywiera dominujący negatywny wpływ na komórki szczepu dzikiego. Przeprowadzone na tej podstawie rozumowanie o kształtowaniu maszynerii translacyjnej przez tworzenie wyspecjalizowanych rybosomów uważam za bardzo inspirujące i ważne przy rozpatrywaniu wpływu różnych czynników natury egzo- i endogennej na proces translacji. Bardzo cenne są także dane, które weryfikują pogląd o mechanizmie działania sordarinu, który za sugestią Autorki może działać na terminację i recykling.

Analizując opis „Wyników" natknąłem się na kilka nieścisłości, które moim zdaniem wymagają komentarza i wyjaśnienia podczas obrony rozprawy doktorskiej. Na rycinie 17 pokazany jest obraz błon z białkami P, identyfikowanymi za pomocą przeciwciał; zaznaczone zostały białka w formie fosforylowanej i niefosforylowanej – na jakiej podstawie Autorka dokowała takiego rozróżnienia?

Na rycinie 20 zaprezentowała dane porównawcze dotyczące czasu generacji komórek u szczepu dzikiego i mutantów, a istotne statystycznie różnice między wartościami oznaczyła gwiazdkami. Jednak niejasne jest, czy oznaczenia te dotyczą porównania wartości uzyskanych dla mutantów i szczepu dzikiego, czy także między dwoma badanymi mutantami? Czy jedna gwiazdka dla danych każdego z mutantów wskazuje, że między opisującymi je wartościami nie ma statystycznie istotnych różnic? A jeśli takie różnice są, to prosiłbym Panią Magister o komentarz w tej sprawie podczas obrony, bo zagadnienie to wydaje się bardzo interesujące. Podobne pytanie mam co do danych prezentowanych na wykresie słupkowym, znajdujących się na rycinie 24. Skomentowania wymaga też „wstawka" na rycinie 26, bo znajdujący się pod nią opis jest niejasny – czy wszystkie dane o wydajności translacji u mutantów są odnoszone do danych dla szczepu dzikiego, czy może w obrębie grup, które traktowano i nie traktowano cykloheksymidem; w opisie ryciny brakuje także informacji jakie dane przypisano słupkom czarnym, a jakie szarym. Podobnego doprecyzowania wymaga opis na rycinie 33.

Na stronie 67 dysertacji pojawia się niespójność opisu wyników z prezentowanymi danymi – Autorka źle oznaczyła ryciny, bo brakuje tej z numerem 28. Przy załażeniu, że rycina zamieszczona w dysertacji między rycinami 27 i 29 ma właśnie numer 28, to trudno zrozumieć zdanie, że (cyt.) „Zastosowane niskie stężenie (50 ng/ml) cykloheksymidu redukuje wydajność procesu translacji dla komórek szczepu dzikiego do poziomu obserwowanego dla komórek mutanta drożdżowego $uL10_{\Delta h1h2}$ bez dodatku antybiotyku (Fig. 28)", w sytuacji, gdy na tej „źle oznaczonej" rycinie brak danych o mutantach. Chyba, że Autorka odnosi te dane do ryciny poprzedniej, czyli 27, ale w takim przypadku informacja taka powinna pojawić się w opisie.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

Komentując wyniki uzyskane podczas analiz profili polisomów Autorka porównuje dane, które zamieściła przy wykresach – w ich górnym prawym rogu (np. o stosunku polisomów do monosomów, jak na rycinach 27, „27/28", 29, 35, 36, 37). Pisze, w tym przypadku, o różnicach lub braku różnic między wartościami ocenianych parametrów, które cechują komórki o danym fenotypie, czy będące w określonym stanie fizjologicznym, ale nie powołuje się na wyniki analiz statystycznych. Prosiłbym o komentarz na ten temat.

Rozdział „Dyskusja" jest w mojej ocenie bardzo dobrze przygotowany. Należałoby się zastanowić, czy pierwsze pięć i pół strony (z trzynastu, jakie ma ten rozdział) należało głównie poświęcić przeglądowi literatury naukowej. Nie krytykuję jednak takiej formuły, bo Autorka zawarła w tym opisie wiele cennych informacji, które albo nie pojawiły się we „Wstępie", albo były wcześniej prezentowane z innej perspektywy. Przedstawienie własnych wyników na tle literatury specjalistycznej oraz ich interpretacja są bardzo dojrzałe. Pani Magister wyciągając wnioski z własnych badań doskonale rozróżnia te, na podstawie których można sformułować tezy (i tu przedstawia liczne argumenty potwierdzając ich słuszność) oraz te, które mogą być podstawą do formułowania hipotez wymagających udowodnienia. Jest to ważna umiejętność, którą w czasie studiów i pracy zdobyła Autorka i którą moim zdaniem należy docenić, bo świadczy o Jej dojrzałości i samodzielności, jako pracownika naukowego. Zresztą kwestii tej można by poświęcić znacznie więcej uwagi, bo Pani Magister jest współautorką 6 prac z listy JCR, co na tym etapie kariery zawodowej należy traktować jako bardzo duże osiągnięcie. „Dyskusja" kończy się podsumowaniem, które *de facto* jest omówieniem modelu, przedstawionego w formie czytelnej grafiki, obrazującego jak mogą działać rybosomy z defektem w strefie, gdzie lokalizują się białka P.

Z racji bycia recenzentem jestem zmuszony do zwrócenia Autorce uwagi na powtarzające się w rozprawie błędy, które nie mają wpływu na ocenę merytoryczną i moją wysoce pozytywną o niej opinię. Podczas przygotowywania innych tekstów sugerowałbym Autorce baczniejsze zwracanie uwagi na interpunkcję, a szczególnie stawianie przecinków przed spójnikiem rozłącznym „a" oraz „czy", gdy występuje w zdaniu w formie partykuły oraz przed zaimkiem „jak", wprowadzającym wypowiedź podrzędną. Podobnie proponuję dokładniejsze sprawdzanie tekstów manuskryptów, aby w przyszłości ustrzec się błędów ortograficznych np. odnoszących się do łącznego zapisu partykuły „nie" z przysłówkami odprzymiotnikowymi i przymiotnikami. Zwracam także uwagę Autorce, że słów „ilość" i „liczba" nie można swobodnie, tzn. wymiennie, stosować w połączeniu z rzeczownikami niepoliczalnymi i policzalnymi.

Mam także kilka uwag dotyczących samego podziału treści dysertacji. Jeśli tekst dzielimy na części, czyli rozdziały, nadając im numery, a rozdziały dodatkowo na podrozdziały, a te z kolei na sekcje, to liczba części na każdym poziomie podziału powinna wynosić dwa lub więcej. Gdy w podrozdziale wyróżniona jest tylko jedna sekcja, to po co ją w ogóle wyróżniać. A właśnie takiego podziału tekstu dokonała Doktorantka w rozdziale „Wstęp".

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Elizy Molestak w oryginalny sposób rozwiązuje problem naukowy. Jej treść świadczy o tym, że Autorka posiada dużą ogólną wiedzę teoretyczną w dziedzinie oraz w zakresie przeprowadzonych badań. Wskazuje na zdobycie przez Panią Magister samodzielności i dojrzałości w realizowaniu prac badawczych. Zatem rozprawa spełnia wymagania

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

określone w art. 13 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Elizy Molestak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę ponadprzeciętną jakość prezentowanych w dysertacji wyników oraz bardzo dojrzałą ich interpretację, z przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady o uhonorowanie Pani Magister stosowną nagrodą za rozprawę, przewidzianą regulaminem Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 026, faks: 22 55 41 030
e-mail: piotrbe@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl