PAŃSTWOWA
WYŻSZA SZKOŁA
TECHNICZNO
EKONOMICZNA

Jarosław, dn. 25.04.2019 r

Prof. dr hab. Nikodem Grankowski
Instytut Ochrony Zdrowia PWSTE
w Jarosławiu

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Szajwaj
pt. „Oddziaływanie katalitycznej podjednostki rycyny na maszynerię translacyjną"
wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej UMCS

Praca doktorska dotyczy oddziaływania rycyny *in vivo* z ważną dla translacji pętlą sarcynowo-rycynową oznaczaną symbolem SRL (od ang. *sarcin-ricin loop*) będącą fragmentem rybosomalnego RNA (rRNA) w podjednosce 60S. Nazwa tej struktury pochodzi od nazwy dwóch toksyn: rycyny i sarcyny, które hydrolizują wiązania między nukleotydami w tym fragmencie rRNA. W ocenianej pracy wykorzystano komórki drożdżowe *Saccharomyces cerevisisae*, które od wielu lat są w Zakładzie Biologii Molekularnej modelem w badaniach struktury i funkcji rybosomu jako centrum biosyntezy białka w komórkach. Drożdże jako organizm jednokomórkowe są wygodne do kontrolowania ich procesów życiowych w zmieniającym się w zależności od potrzeb składem hodowlanego podłoża płynnego lub stałego. Ponadto, co było bardzo ważne dla tych badań to możliwość wykonywania manipulacji genetycznych w prostym organizmie eukariotycznym.

Rycyna należy do śmiertelnych trucizn roślinnych wytwarzanych przez rącznika pospolitego (*Ricinus communis* L). Jest to substancja białkowa rozpuszczalna w wodzie. Zbudowana jest z dwóch podjednostek zwanych: łańcuchem A określanego symbolem RTA i łańcucha B o symbolu RTB. Obie podjednostki zawierają ponad 260 aminokwasów i są połączone ze sobą mostkiem -S-S-. Toksyczną aktywność posiada podjednostka A, zaś podjednostka B odpowiedzialna jest za wiązanie się rycyny z błoną komórki eukariotycznej i wynikanie toksyny do jej wnętrza. Miejscem działania toksycznej RTA jest rRNA, w którym

znajduje się wspomniana pętla sarcynowo-rycynowa (SRL) zawierająca bardzo ważny w tych badaniach nukleotyd adeninowy.

Struktura rozdziałów ocenianej pracy jest prawidłowa dla opracowań tego typu. Całość poprzedzona jest jasnym i zwięzłym Streszczeniem, przedstawiającym zrealizowane zadania badawcze przedstawione w Celu pracy. Następna część pracy to Wstęp, w którym opisywana jest roślinna synteza rycyny, jej losy po wniknięciu do wnętrza komórki oraz interakcja z rybosomem. Bardzo ważny jest tu opis centrum katalitycznego RTA i mechanizm działania rycyny *in vitro*, która hamuje proces przyłączenia się do rybosomu translacyjnych czynników o aktywności GTP-az. Jest to wynik depurynacji SRL przez RTA, podczas której z pętli sarcynowo-rycynowej usuwany jest nukleotyd adeninowy odgrywający kluczową rolę w interakcji rybosomu z translacyjnymi GTP-azami. Prowadzi to do blokady hydrolizy GTP dostarczającej energii maszynerii translacyjnej w całym procesie biosyntezy białka w komórce. Kolejny poruszony problem to odpowiedź metaboliczna komórki *in vivo* na obecność rycyny. Jedyna jak dotąd praca przedstawiająca wpływ RTA na komórki drożdżowe wskazuje, że blok translacji w tym organizmie przez rycynę nie prowadzi wprost do apoptozy. Inne prace, w których wykorzystano komórki ssacze wskazują, że rycyna wywołuje zmiany w przepuszczalności błony mitochondrialnej lub może aktywować kaskadę kinaz białkowych MAP, co prowadzi wprost do apoptozy komórki. Tak więc problem pozostaje otwarty. Wstęp kończy się optymistycznym akcentem o zastosowaniu rycyny w medycynie. Trucizna ta ze względu na antyproliferacyjną i proapoptotyczną aktywność może mieć zastosowanie w skutecznym zwalczaniu nowotworów a nawet wirusa HIV na co są już dowody.

W podsumowaniu Wstępu stwierdzam, że całość informacji oparta na bogatym piśmiennictwie przedstawiona jest w sposób bardzo ale to bardzo interesujący i klarowny, chociaż materia poruszanych problemów nie jest prosta. Duży wpływ na taką ocenę ma bardzo dobry wybór kilkunastu rysunków i schematów ułatwiających śledzenie mechanizmu toksycznej aktywności rycyny.

Cel badań doktorantki wynikał z braku danych literaturowych dotyczących mechanizmu toksyczności rycyny na komórkę w warunkach *in vivo*. Dlatego na samym początku została zaplanowana kontrolowana ekspresja genu RTA w komórce drożdżowej. Było to niezbędne do weryfikacji wyników badań *in vitro* innych autorów. Ostatecznym celem pracy była obserwacja fenotypu komórek drożdżowych z genem toksycznej podjednostki rycyny-RTA w różnych warunkach hodowli.

Do realizacji celów badawczych zastosowano i opisano w Materiałach i Metodach nowoczesne z tzw. górnej półki metody i techniki badawcze wykorzystywane w biologii

molekularnej, biochemii, genetyce, mikrobiologii i immunologii. Należą do nich między innymi: metoda RT-qPCR do pomiaru zdepurynowanego rRNA w rybosomach, transformacja genu RTA na plazmidzie, cytometria przepływowa do analizy morfologii komórek, inkorporacja znakowanych związków radioaktywnych do pomiaru wydajności maszynerii translacyjnej oraz szereg innych metod i technik badawczych.

Zgodnie z celami badawczymi część doświadczalna pracy przedstawiona w Wynikach zaczyna się od wprowadzenia do komórek drożdżowych genu RTA na plazmidzie. Ekspresję genu katalitycznej podjednostki RTA, kontrolowano z użyciem promotora GAL I w hodowli komórek z glukozą, której celem była represja genu lub w hodowli z galaktozą zapewniającą indukcję ekspresji genu RTA. Obecność syntetyzowanego białka RTA sprawdzano metodą immunodetekcji – *western blotting*. Dysponując funkcjonującym i regulowanym układem genetycznym wykazano, że mimo wzrostu ekspresji genu RTA i znacznym wzrostem depurynacji SRL nie obserwowano różnic w profilach polirybosomów komórek kontrolnych (bez RTA) i komórek z genem RTA. Świadczy to wprost o braku wpływu depurynacji SRL na biogenezę rybosomów. Obserwowano natomiast spadek tempa wydajności końcowych etapów translacji (elongacji i terminacji). Do zbadania *in vivo* precyzji funkcjonowania rybosomów zastosowano system reporterowy podwójnej lucyferazy, dzięki któremu zanotowano następujące wyniki: 1. - wzrost od 26%-50% pomyłek rybosomu w inkorporacji niewłaściwych aminokwasów do syntetyzowanego peptydu, 2. – nie zaobserwowano wzrostu częstotliwości supresji kodonu stop a więc depurynacja SRL jest bez istotnego wpływu na proces terminacji syntezy peptydu, 3. – nie obserwowano korelacji między poziomem depurynacji SRL a obniżeniem częstotliwości zmiany ramki odczytu o jeden nukleotyd. Tak więc maszyneria translacyjna funkcjonowała cały czas mimo depurynacji.

W związku z brakiem istotnych różnic we wpływie depurynacji na aktywność translacyjną rybosomów w warunkach *in vivo,* dociekliwość eksperymentatorki została zwrócona na analizę fenotypu komórek z genem RTA. Na początek okazało się, że żywotność komórek z tym genem w porównaniu z komórkami kontrolnymi różniła się zaledwie o kilka procent a więc w granicach błędu statystycznego. Fakt ten skierował zainteresowania doktorantki na analizę cyklu komórkowego, który badano na płytkach z agarem zawierającym pożywkę nieselekcyjną z kompletem aminokwasów. Okazało się, że komórki z genem RTA rosły w tych warunkach tak samo jak komórki kontrolne, co tłumaczy doktorantka utratą przez komórkę genu RTA i odzyskaniem zdolności do namnażania się podobnie jak komórki kontrolne. A co z atrybutem rozmnażania się komórek drożdżowych czyli pączkowaniem? Stosując do obserwacji mikroskop konfokalny obserwowano hamowanie procesu

pączkowania komórek z genem RTA przy jednoczesnym wzroście objętości komórki matczynej. By wyjaśnić ten problem wykonana została analiza potencjału reprodukcyjnego pojedynczej komórki. I tu okazało się, że zaledwie kilkanaście procent komórek z RTA było zdolne wytwarzać więcej niż trzy pączki, podczas gdy komórki kontrolne wykazywały taką zdolność w około 90%. Badanie cyklu komórkowego kończy się sprawdzeniem okresu zdolności reprodukcyjnej komórki drożdżowej z genem RTA. Okres ten dla komórek z tym genem to poniżej 10% całego okresu ich życia podczas gdy dla komórek kontrolnych wynosił on 50%.

Wszystkie te fakty jednocześnie wskazują, że depurynacja *in vivo* jednego z głównych elementów centrum GTP-azowego aparatu translacyjnego, a więc SRL, hamuje procesy mitotyczne i tworzenie się nowych komórek co może indukować inne procesy metaboliczne. By dojść do takiego wniosku, doktorantka musiała wykonać wprost benedyktyńską pracę. W podsumowaniu tej części pracy pragnę zwrócić uwagę na bardzo staranną i czytelną jakość kilkudziesięciu rysunków, fotogramów i tabel, które przekonywały recenzenta o trafności i kolejności podejmowanych kolejnych badań.

Pracę doktorską kończy rozdział Dyskusja zawierający omówienie interesującego nie tylko pod względem teoretycznym ale i praktycznym problemu toksyczności rycyny. Wszystko zaczyna się od opisania aspektów militarno-medycznych z dodatkiem historii, by przejść do meritum sprawy a więc dyskutowanie o podobieństwach i różnicach wpływu rycyny w warunkach *in vitro* i *in vivo* na maszynerię translacyjną, ze szczególnym zwróceniem uwagi na aktywność translacyjną rybosomów. Znaczna część Dyskusji poświęcona jest tylko własnym badaniom i wynikom, które krok po kroku dawały odpowiedź na kolejne pytania, bądź kierowały do zajęcia się nowym problemem. Trzeba być bardzo zdeterminowanym jak autorka pracy by opanować kolejne i kolejne metody i techniki badawcze służące rozwiązywaniu kolejnych problemów. Tym bogactwem metod i technik można by obdzielić ze dwie a może nawet trzy prace. Na koniec zacytuję ostatnie zdanie z Dyskusji, z którym zgadzam się całkowicie: cyt"... rybosomy ze zdepurynowaną pętlą sarcynowo-rycynową stanowią pulę rybosomów sygnalnych, które indukują szlak metaboliczny zarządzający cyklem komórkowym, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia aktywności translacyjnej oraz potencjału reprodukcyjnego komórek" (koniec cytatu).

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę autorce pracy doktorskiej na pewne sformułowania/określenia, których nie powinno używać się zwłaszcza w tekście pisanym pracy doktorskiej. Przykłady: sekwencja RNA, 28S rRNA szczura, pętla sarcynowo-rycynowa szczura i *E coli*, mieszanina składająca się, długość etapu reprodukcji komórek,

poziomu rybosomów itp. Potknięcia językowe czy nawet żargon przy odrobinie dobrej woli da się każdemu wyeliminować, ale wytrwałość, dociekliwość i inteligencja badawcza to już trwałe, osobnicze cechy eksperymentatora, które posiada autorka pracy.

Wniosek końcowy:

W związku z moją jednoznacznie bardzo pozytywną oceną pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Szajwaj zatytułowaną „Odziaływanie katalitycznej podjednostki rycyny na maszynerię translacyjną" wnoszę o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proponuję odpowiednie nagrodzenie doktorantki po przyjęciu do druku publikacji z wynikami badań zawartymi w pracy.

Mikołaj Szewczyk