



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Biomedyczny

Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego

ul. Chodźki 4a, 20-093 LUBLIN

e-mail: anna.sroka@umlub.pl

dr hab. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM
Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego
Wydział Biomedyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin 03.07.2022 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Moniki Dźwierzyskiej** zatytułowanej „*Interakcja ludzkich rybosomalnych białek P z katalityczną podjednostką rycyny*” wykonanej pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Marka Tchórzewskiego oraz Promotora Pomocniczego dr Przemysława Greli w Katedrze Biologii Molekularnej, na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Temat podjęty przez doktorantkę wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu szeroko pojętej maszynery translacyjnej. Celem badawczym w niniejszej pracy było zdefiniowanie roli poszczególnych białek P, a przede wszystkim roli indywidualnych fragmentów C-terminalnych w interakcji z białkiem RIP (ang. *Ribosomal Inactivating Proteins*) - rycyną. Podjęto działania w celu szczegółowego zbadania interakcji ludzkich kompleksów białek P oraz ich form delecyjnych z katalityczną podjednostką rycyny (RTA). Należy podkreślić, że pomimo wielu lat badań w tej tematyce, interakcja białek RIP z rybosomalnymi białkami P nie była dokładnie zbadana, dlatego prowadzenie badań naukowych w tym zakresie jest w pełni potrzebne i uzasadnione.

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Tekst obejmuje 171 stron i składa się z następujących części: Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Abstrakt, Bibliografia, Wykaz publikacji i osiągnięć autora.

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie interakcji katalitycznej podjednostki rycyny (białka z grupy RIP) z poszczególnymi elementami CTD w obrębie ludzkich białek P1 i P2. Pierwszym etapem było otrzymanie rekombinowanych, pełnych białek P1/P2, ich form delecyjnych P1ΔC/P2ΔC, (pozbawionych 16 reszt aminokwasowych na C-terminalnym końcu) oraz białka RTA. Tak otrzymane struktury białka rekombinowanego wykorzystano do uformowania poszczególnych kompleksów białkowych: natywnego heterodimeru P1-P2, heterodimerów delecyjnych - P1-P2ΔC, P1ΔC-P2, P1ΔC-P2ΔC oraz homodimerów P2-P2 i P2ΔC-P2ΔC. Następnie uzyskane dimery białek P

przeanalizowano pod kątem strukturalnym z wykorzystaniem metod biofizycznych, takich jak SEC, CD, nanoDSF czy „native”-MS. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka zaproponowała model interakcji heterodimeru P1-P2 z białkiem RTA.

W części teoretycznej rozprawy nazwanej **wstępem** Doktorantka opisuje w bardzo przystępny sposób stan wiedzy na temat topologii i struktury rybosomu. Opisuje małą i dużą podjednostkę rybosomalną, a następnie przechodzi do szczegółowego opisu centrów aktywnych. Kolejny podrozdział jest poświęcony białkom z grupy RIP.

Część dysertacji nazwana **materiały i metody** jest bardzo szczegółowo zaprezentowana na 18 stronach. Doktorantka opisuje każdy etap projektowania obiektu badawczego oraz proces oczyszczania uzyskanych białek. Opisuje w bardzo przystępny sposób zasadę działania każdej z wykorzystywanej metody analitycznej, co nadaje tej pracy bardzo edukacyjny charakter. Wszystkie opisane protokoły pomiarowe opracowano optymalizując warunki pozyskania i przygotowania materiału do badań, ilość dostępnego materiału, oraz charakterystykę otrzymanych izolatów. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka przeprowadzając charakterystykę biochemiczną i biofizyczną otrzymanych rekombinowanych białek zastosowała jedną z najnowocześniejszych metod spektrometrii mas w warunkach niedenaturujących „Native –MS”.

Część pracy dotycząca **wyników** jest również bardzo obszernie opisana na 55 stronach. Część badawcza została podzielona na 4 etapy - cytuję:

- „a) Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie ludzkich białek rybosomalnych P1, P2 oraz ich form delecyjnych P1 Δ C/P2 Δ C, pozbawionych 16 reszt aminokwasowych na C - terminalnym końcu białek P1 i P2;
- b) Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie katalitycznej podjednostki rycyny – RTA;
- c) Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna otrzymanych rekombinowanych białek z wykorzystaniem metod chromatograficznych, dichroizmu kołowego oraz spektrometrii mas.
- d) Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny za pomocą termoforezy mikroskalowej - MST oraz interferometrii bio-warstwowej - BLI.,

Wnioski końcowe zostały i przedstawione w formie podsumowania oraz przejrzystej ryciny. Zaś dyskusja wyników obejmuje 16 stron. Z przeprowadzonych wyników badań wynika, że heterodimeryczna konformacja P1-P2 w obrębie struktury „kciuka” rybosomalnego stanowi optymalne miejsce wiązania RTA oraz wskazano, że fragmenty CTD białek P1 i P2 mają nierównocenną rolę w interakcji z RTA, z białkiem P1 jako zasadniczym elementem wiążącym toksyny RIP.

Obowiązkiem recenzenta jest także krytyczny komentarz ocenianej pracy. Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka pytań:

1. W związku z możliwością modyfikacji post-translacyjnych w postaci fosforylacji w obrębie C-końca białek P, czy Doktorantka zastanawiała się jaki wpływ może odgrywać wprowadzenie grupy fosforanowej na badane oddziaływania?

2. Doktorantka w przedstawionej rozprawie nie uzasadniła wyjaśniająco dlaczego to właśnie rycyna jako białko typu II zostało wybrane jako główny obiekt badawczy, nie podjęła również dyskusji na temat czy inne białka z tej samej grupy oddziaływałyby w ten sam sposób?
3. Doktorantka prezentuje badania interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny za pomocą kilku technik m.in. interferometrii biowarstwowej (ang. *bio-layer* interferometry, BLI) oraz termoforezy mikroskalowej (ang. *microscale thermophoresis*, MST). W wyniku badań uzyskano nieco rozbieżne wyniki wartości K_d – w przedstawionej dysertacji brakuje analizy porównawczej uzyskanych wyników.
4. W niniejszej rozprawie doktorskiej Pani mgr Dźwierzynska nie podejmuje dyskusji jaki wpływ oddziaływania rycyny (RTA) z badanym układem dimerów P1-P2 może mieć ich N terminalna część białka?

Tematyka przedstawionej pracy badawczej jest bardzo ważna i ciekawa. Niestety tylko część wyników badań została dotychczas opublikowana. Czy Doktorantka będzie podejmowała dalsze działania, które doprowadzą do opisanie uzyskanych wyników w formie kolejnych publikacji naukowych?

Recenzowana dysertacja Doktorantki została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest przejrzyste opracowana graficznie. Praca zawiera Wykaz skrótów, których Autor prezentuje 38 na 2 stronach maszynopisu. Jest 6 tabel i 88 rycin. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 227 pozycji, w przeważającej części pochodzi z ostatnich lat jest wykorzystane i zacytowane właściwie. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka popełniła kilka błędów edytorskich, np. str. 135 „wysokocząsteczkowych agregatów” a powinno być „wielkocząsteczkowych” oraz wystąpiły tzw. „literówki” co oczywiście jest nieuniknione i w żaden sposób nie wpływa na wartość pracy, np. str. 9, 62, 63, 86.

Wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest istotnie bardzo ważna, a Pani mgr Monika Dźwierzynska skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazała dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi podsumować i omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Na koniec chciałam podkreślić całokształt pracy Doktorantki. Oprócz dorobku związanego bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej 1 praca o wartości IF 4,61 (zgodnie z rokiem opublikowania). Pani mgr Monika Dźwierzynska jest współautorem również 2 innych prac. Podsumowując jej całkowity dorobek naukowy to 3 prace. Prowadzone badania finansowane były w ramach projektu naukowego Narodowego Centrum Nauki, projekt OPUS (UMO-2014/13/B/NZ1/00953), grantu National Institute of Health AI072425 oraz NIH TW008418 Fogarty International Center Collaboration Award (FIRCA).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie **wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Moniki Dźwierzynskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

dr hab. Anna Sroka-Bartnicka
Profesor uczelni

dr hab. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM