



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI

HARVARD
UNIVERSITY



Boston, MA, 10.06.2024

MAŁOPOLSKIE CENTRUM
BIOTECHNOLOGII

VISITING PROFESSOR
(2024-2025)

e-mail: grzegorz.dubin@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Wiolety Banaszuk pt. „Regulacja metabolizmu aminokwasów poprzez aktywność aparatu Golgiego”

Rozprawa doktorska mgr. Wiolety Banaszuk opisuje badania mechanizmów adaptacyjnych indukowanych w odpowiedzi na stres osmotyczny. Autorka postuluje istotną rolę transportera aminokwasów SNAT2 w odpowiedzi na stres, analizuje wybrane aspekty modyfikacji posttranslacyjnych jakim podlega ten transporter w ER i aparacie Golgiego oraz wpływ badanych procesów na szlak sygnałowy kinazy ERK1/2.

Rozprawa jest przygotowana w sposób rzetelny, choć zawiera pewne niedociągnięcia kompozycyjne i interpretacyjne. W swojej recenzji wymieniam jedynie skrótowo osiągnięcia pracy, gdyż te są w niej wystarczająco dobrze opisane. Skupiam się natomiast na krytycznej dyskusji prezentowanych wyników, wniosków i kompozycji pracy. Nie ma to na celu dyskredytacji badań, które w wielu miejscach są ciekawe. Mam raczej nadzieję, iż skłoni to autorkę do dalszych przemyśleń, a w przyszłości pozwoli ustrzec się choćby niektórych z niedociągnięć. Analizy tej nie należy więc w żadnym razie odczytywać jako wyrazu negatywnej opinii, a jedynie jako konstruktywną krytykę rozprawy.

Tytuł pracy jest stanowczo zbyt szeroki w stosunku do podejmowanej tematyki. Znacznie lepiej byłoby wskazać w tytule, iż praca obejmuje badania roli białka SNAT2 i szlaku ERK1/2 w odpowiedzi na stres osmotyczny, co odpowiadałoby właściwej tematyce pracy. Podobnie, czytelność streszczenia zyskałaby znacząco na skupieniu się na konkretach dotyczących pracy w jego wprowadzającej części. Streszczenie powinno zawierać wprowadzenie w tematykę pozwalające na zrozumienie wagi konkluzji które są następnie krótko podsumowane w dalszej części streszczenia. W przedstawionej pracy pierwszy akapit wprowadza kinazy mTOR i GCN2 które nie stanowią bezpośrednio tematu pracy. Następny z kolei paragraf mówi, że w pracy badano białka SNAT2 i ERK1/2 które nie zostały zupełnie wprowadzone, a ich powiązanie ze szlakami mTOR i GCN2 jest na tym etapie opracowania całkowicie niejasne. Kolejne paragrafy zawierają bardzo szczegółowe streszczenie wyników, które jest również zupełnie niezrozumiałe przed lekturą całości pracy. Po lekturze całości pracy stwierdzam, że streszczenie jest jej świetnym podsumowaniem, nadającym się jednak na zakończenie, a nie na początek. Streszczenie powinno zachęcić do lektury pracy zarówno eksperta jak i laika, a tego nie da się osiągnąć przytaczając szczegóły bez wskazania powiązań między nimi czy głównych konkluzji. Analogiczne odczucia mam po lekturze wstępu. Zawiera on bardzo rzetelnie przygotowane podsumowanie bardzo bogatej literatury, skupia się jednak zbyt na szczegółach – często nieistotnych z punktu widzenia badań przedstawionych w pracy, kosztem systematycznego wprowadzenia. Kilka stron prostego wprowadzenia w tematykę które pozwoliłyby właściwie umiejscowić następujący potem natłok szczegółów byłoby tutaj bardzo pożądane. Podobnie jak w przypadku tytułu, we wstępie brakuje jasno nakreślonego kierunku pracy który pozwoliłby zrozumieć wagę przytaczanych informacji przed lekturą części wyników. Prawie cała potrzebna

informacja znajduje się w opracowaniu, ale grzęźnie w ilości przytaczanych szczegółów z których wiele, choć ciekawych, jest nieistotnych z punktu widzenia prac opisanych w rozprawie. Zbyt szeroko sformułowany temat powoduje - na etapie lektury wstępu - brak jasnej koncepcji kierunku pracy. Kierunek ten staje się jasny dopiero w środku części rozdziału „wyniki”, a to stanowczo za późno z punktu widzenia kompozycji rozprawy.

Powyższe uwagi nie zmieniają faktu, iż zarówno streszczenie jak i wstęp są przygotowane bardzo rzetelnie. Szczególnie wstęp daje szeroki i pełny ogląd podejmowanych zagadnień przy cytowaniu imponującej ilości literatury i swobodnie mógłby stanowić niezłą pracę przeglądową. Dla mnie osobiście wstęp jest jednak zbyt długi i zawiera zbyt wiele informacji które nie są niezbędne do interpretacji wyników. Jest to jednak kwestia subiektywna i z pewnością nie jest to zarzut który dyskredytowałby jakość pracy. Zarzutem jest jednak brak ukierunkowania podawanej informacji. Autorka powinna na przyszłość rozważyć podawanie skomplikowanej, wielowątkowej informacji w bardziej ukierunkowanej formie. Wstęp do pracy eksperymentalnej to nie praca przeglądowa. W pierwszym przypadku podaje się tylko informację niezbędną, a nie wszelką dostępną.

Przechodząc do omówienia części wyniki - podstawowym pytaniem na jakie nie znalazłem odpowiedzi w pracy jest pytanie o fizjologiczne znaczenie stresu osmotycznego. W swoich badaniach autorka indukuje stres osmotyczny przez przeniesienie komórek do odpowiedniej pożywki. W jakiej jednak fizjologicznej sytuacji komórki, takie jak np. fibroblasty lub komórki nowotworowe, które bada autorka, mogą być narażone na stres osmotyczny? Bardzo proszę o odniesienie się do tego kluczowego dla oceny istotności podejmowanej tematyki zagadnienia podczas obrony.

Za mocne strony pracy uważam:

- (i) Wykazanie indukcji ekspresji i lokalizacji błonowej transportera SNAT2 w odpowiedzi na stres osmotyczny
- (ii) Wykazanie niezależnej od ISR indukcji ekspresji GADD34 w odpowiedzi na stres osmotyczny
- (iii) Wykazanie iż efekt (i) i (ii) nie jest specyficzny dla pojedynczej linii komórkowej, a raczej charakterystyczny dla wielu różnorodnych linii
- (iv) Wykazanie roli transportera SNAT2 w przeciwdziałaniu indukcji apoptozy przez stres osmotyczny
- (v) Scharakteryzowanie zmian komórkowego stężenia aminokwasów w odpowiedzi na stres osmotyczny
- (vi) Wykazanie, że końcowa N-glikozylacja jest niezbędna dla dostarczania transportera SNAT2 do błony komórkowej.
- (vii) Wykazanie iż aktywacja MEK/ERK w warunkach stresu jest niezależna od czynników wzrostu

Za słabe strony pracy uważam przede wszystkim:

- (i) zbyt szerokie zdefiniowanie tematyki pracy przez co każdy z poruszanych tematów jest analizowany powierzchownie podczas gdy sam w sobie mógłby stanowić temat osobnej pracy lub szeregu prac naukowych (np. Mechanizmy indukcji odpowiedzi na stres osmotyczny. Współzależności funkcjonalne transporterów aminokwasów i przemian metabolicznych w odpowiedzi na stres osmotyczny. Mechanizmy i funkcjonalna rola glikozylacji SNAT2. Szlaki aktywacji ERK1/2 przez stres

osmotyczny, Rola aktywacji ERK1/2 w stresie osmotycznym, itd.). Ze zbyt szerokiego i ogólnego podejścia wynika cały szereg opisanych niżej problemów szczegółowych.

- (ii) W całej pracy autorka ma tendencję do wyciągania definitywnie sformułowanych, szerokich konkluzji z pojedynczych eksperymentów nie popartych dalszą analizą. Choć przedstawione pojedyncze eksperymenty zwykle wydają się przejrzyste do formułowanych konkluzji prowadzić, to jednak należy pamiętać, iż w tak skomplikowanym, wieloskładnikowym układzie jak analizowany przez autorkę należałoby najpierw przeprowadzić znacznie szerszej zakrojone analizy eliminujące inne możliwe ewentualności, a nawet wtedy konkluzje należałoby formułować ostrożniej. By podać proste przykłady: (strony 100-101) autorka obserwuje trzy prążki w analizie WB dla białka SNAT2. Po pierwsze, formalnie nie ma dowodu iż wszystkie prążki pochodzą od białka SNAT2, gdyż w analizie WB często obserwujemy niespecyficzne barwienie białek trzecich. Nawet jeśli założyć, że wszystkie prążki pochodzą od białka SNAT2, nie ma bezpośredniego dowodu, iż odpowiadają one różnie glikozylowanym formom, co autorka kategorycznie sugeruje w tekście. Wszystkie eksperymenty biologiczne wymagają kontroli. Wyciszenie białka SNAT2 stanowiłoby dobrą kontrolę dla specyficzności przeciwciał (tym bardziej, że autorka posiada odpowiednie linie komórkowe); enzymatyczne usunięcie glikanów mogłoby być prostym eksperymentem rozwiewającym drugą wątpliwość. Dane takie nie są jednak przytoczone w pracy. Innym przykładem niech będzie konkluzja przedstawiona na stronie 134: „spadek poziomu poliamin w komórce promuje LLPS” - w pracy nie ma żadnych eksperymentów badających wpływ poliamin na LLPS ani właściwie w ogóle eksperymentów charakteryzujących LLPS. Pewne przesłanki można wynieść z analizy literatury, jednak przed eksperymentalnym wykazaniem w badanym układzie są to tylko hipotezy. Przypadki te przytaczam jedynie jako proste przykłady. W sposób istotny ilustrują one jednak cały szereg tego typu nadinterpretacji występujących w pracy na różnych poziomach – od analizy poszczególnych eksperymentów do szczególnie nieuzasadnionych uogólnień dotyczących całych skomplikowanych procesów. W przypadku braku pewności, czym innym jest sugerowanie interpretacji, a czym innym kategoryczne stwierdzanie nie do końca zweryfikowanych faktów. Odnosi się to w pewnym względzie do warstwy językowej, jednak to język kształtuje naszą interpretację świata, a biolog, pracujący z niezwykle skomplikowanym układem, powinien być zawsze ostrożny w czarno-białej interpretacji danych i wyciąganiu zbyt daleko idących wniosków bez odpowiedniego poparcia eksperymentalnego. Odważne hipotezy prowadzą do ciekawych badań. Nie potwierdzone eksperymentem wnioski prowadzą na manowce.

Na początku swojej pracy autorka przedstawia ogólną charakterystykę modelu wykazując indukcję ekspresji białka SNAT2 w warunkach stresu osmotycznego (Rys. 20), docelową lokalizację formy w pełni glikozylowanej w błonie komórkowej (Rys. 23; konkluzje dot. form D i ER warto by poprzeć przez enzymatyczne usunięcie cukrów) i protekcyjną / antyapoptotyczną rolę SNAT2 w warunkach łagodnego stresu osmotycznego (Rys. 25). Autorka postuluje też brak udziału zintegrowanej odpowiedzi na stres (ang. ISR) na dowód czego przytacza wyniki uzyskane dla niefosforylowalnej muteiny eIF2 α (S51A). Interpretacja tej części wyników nie jest jednak dla mnie jasna w świetle informacji przedstawionych we wstępie. W linii komórkowej MEF S51A autorka wciąż obserwuje indukcję ekspresji GADD34 podczas gdy na stronach 32-34 wstępu sugeruje, iż ekspresja GADD34 jest zależna od ATF4, a więc od indukcji ISR. Rozumiem, że niezależna od fosforylacji eIF2 α ekspresja GADD34 to nowa obserwacja – efekt

badania prowadzonych przez autorkę. Ta ciekawa obserwacja pozostaje jednak bez dalszego rozwinięcia czy to w formie eksperymentalnej czy choćby spekulacyjnej. Proszę o wyjaśnienie tego zagadnienia podczas obrony ze wskazaniem postulowanych szlaków indukcji ekspresji GADD34. Niezależnie od powyższego pytania, w tej części pracy brakuje mi także kompleksowego wykazania braku indukcji ISR przez szerszą analizę składników szlaku sygnałowego i efektorów.

W dalszej części pracy autorka bada wpływ stresu osmotycznego na globalne zmiany stężenia aminokwasów w komórce. Rozdział ten jest równie ciekawy co, niestety, słabo rozbudowany eksperymentalnie. Autorka posługuje się ciekawą metodą pozwalającą na określenie poziomu wszystkich aminokwasów w komórce. Wykazuje, iż stężenia praktycznie wszystkich aminokwasów ulegają zmianie w odpowiedzi na stres osmotyczny (na marginesie – istotność poziomu zmian powinna być przeanalizowana metodami statystycznymi). Następnie próbuje interpretować rolę poszczególnych transporterów w obserwowanych zmianach, i tutaj niestety praca staje się mocno spekulacyjna. Autorka sugeruje, że zmiany stężenia niektórych aminokwasów są wynikiem metabolizmu komórkowego (np. Ala, Pro) gdyż brak ich w pożywce, a więc zmiany ich stężenia nie mogą być bezpośrednio wynikiem importu. Jednocześnie wskazuje że zmiany stężenia innych (np. Ser, Gly) są efektem importu z pożywki. Brak jednak na to jednoznacznych dowodów. Aminokwasy te mogą być także pozyskiwane na drodze anabolicznej w komórce. Pewne światło na te zagadnienia rzucają eksperymenty z wykorzystaniem inhibitorów transporterów SNAT2 i LAT1, jednak eksperymenty te należałoby znacząco rozbudować z uwagi na stopień skomplikowania badanych sieci współzależności. Nawet bez znaczącej zmiany stosowanej metodologii można sobie łatwo wyobrazić badania na pożywkach z wyeliminowanymi poszczególnymi aminokwasami lub przy ich nadmiarze, co zapewne dałoby dalsze przesłanki do weryfikacji stawianych hipotez. Z uwagi na potencjalne efekty off-target (ang.) w przypadku stosowania inhibitorów należałoby przeprowadzić równoległe eksperymenty na szczepach z inaktywowanymi transporterami (choćby siRNA; zaskakującym jest tutaj fakt iż autorka posiada szczep z usuniętym transporterem SNAT2 i nie testuje tego szczepu równoległe z inhibitorem SNAT2, co pozwoliłoby ustalić stopień specyficzności inhibitora – proszę o informację jaki jest tego powód?). Jak np. można wyjaśnić wpływ MeAIB (inhibitora SNAT2) na zmniejszenie stężenia Ala i Pro gdy chwilę wcześniej sugerowano zmiany stężenia tych aminokwasów pochodzą z przemian wewnątrzkomórkowych? Przemiany metaboliczne wewnątrz komórki można by śledzić klasyczną metodyką pulse-chase (ang.) o co aż prosiłoby się w przypadku nietypowego wzrostu stężenia Gln, na temat pochodzenia którego można jedynie spekulować na podstawie przedstawionych danych. Itd. W obecnym stanie, wobec stosunkowo ograniczonego materiału eksperymentalnego, tą część pracy należałoby raczej uznać za zbiór ciekawych obserwacji wstępnych, o których hipotetyczną interpretację można by pokusić się w części dyskusja. Interpretacja podana w części wyniki jest jednym z możliwych wyjaśnień obserwowanych wyników i jako taka mogłaby stanowić świetną bazę do planowania dalszych eksperymentów, nie można jej jednak uznać za jednoznaczne rozwiązanie problemu, co zdaje się sugerować tekst pracy. Autorka konkluduje np. „Uzyskane dane wskazują, że zwiększona aktywność transportowa SNAT2 w czasie osmoadaptacji, pośredniczy w wychwycie wielu aminokwasów...”, zwiększona aktywność transportera nie jest jednak nigdzie pokazana wprost. Autorka wykazuje nadekspresję transportera, jego lokalizację w błonie komórkowej, zmiany stężenia aminokwasów – jednak nie zwiększoną aktywność samego transportera. Itd. Ogólnie, tą część pracy uważam za najslabszą z uwagi na bardzo ograniczoną (w stosunku do stopnia skomplikowania badanego zagadnienia) liczbę przeprowadzonych eksperymentów których wyniki nie potwierdzają jednoznacznie konkluzji jakie stara się wysnuć autorka.

W dalszej części pracy autorka, potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące wpływu stresu osmotycznego na ekspresję transportera SNAT2 w różnych liniach komórkowych. Podejście to uważam za bardzo wartościowe. Wykazanie efektu w szeregu różnorodnych linii komórkowych wskazuje, iż badany efekt nie jest cechą konkretnych komórek, a raczej procesem ogólnym, a tym samym jest interesujący do dalszej charakterystyki empirycznej.

Dobrym pomysłem jest także zakończenie spójnej tematycznie części pracy podrozdziałem „wnioski”, porządkującym główne osiągnięcia. Niestety, tak jak niektóre konkluzje zawarte we wcześniejszym tekście, niektóre z wniosków są znaczącą nadinterpretacją nie znajdującą potwierdzenia w materiale eksperymentalnym. Np. strona 99, punkt 1.4 „Aktywność transportera SNAT2 moduluje aktywność mTROC1, poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowej puli aminokwasów...” W pracy wykazano zwiększenie ekspresji transportera SNAT2, wykazano także hamowanie mTROC1, jednak związek przyczynowy tych obserwacji nie został wykazany. Nie podjęto nawet prac w tym kierunku.

W kolejnych rozdziałach autorka analizuje rolę glikozylacji w ER i Golgi w dostarczaniu SNAT2 do błony komórkowej. Niewątpliwym osiągnięciem tej części pracy jest wykazanie, iż późna modyfikacja glikanu zachodząca już po etapie kontroli jakości w cyklu kalneksyny jest niezbędna do prawidłowej lokalizacji SNAT2 w błonie komórkowej oraz wykazanie roli transportera SLC35A2 (i w mniejszym stopniu SCL35A4) w tym procesie (Nie zgodzę się jednak ze stwierdzeniem, iż dane przedstawione w pracy wskazują, iż SLC35A4 pełni „bardzo ważne funkcje regulacyjne” (strona 109)). Moje uwagi do tej części pracy dotyczą także stosowanej terminologii. Autorka używa pojęcia „dojrzewanie” białka bez jego odpowiedniego zdefiniowania co rodzi problem z formułowaniem pewnych konkluzji. W pewnych miejscach tekstu dojrzewanie dotyczy procesu formowania glikanu, w innych autorka zdaje się sugerować, iż formowanie glikanu ma wpływ na fałdowanie białka. Praca odnosi się jedynie do końcowych etapów formowania glikanu. Praca nie podaje żadnych przesłanek eksperymentalnych by powiązać ten proces z fałdowaniem białka ani jego aktywnością (jak sugerowałby tytuł rozdziału 2, strona 100). Stosowana metodologia badawcza pozwala jedynie stwierdzić dostarczenie badanego białka do błony komórkowej i zdolność do transportu aminokwasów. Aktywność jest w tekście pracy utożsamiana z błonową lokalizacją. Może być jednak przecież tak, iż białko nie w pełni glikozylowane jest aktywne (jeśli chodzi o zdolność transportu aminokwasów) ale jako, że nie lokuje się w błonie komórkowej aktywność ta nie wyraża się w stosowanych testach. Jest to wtedy defekt transportu, a nie defekt aktywności jako takiej. Kwestie te są o tyle znaczące, iż proces kontroli jakości białek w ER/Golgi stanowi temat żywych badań, a jedną z kluczowych kwestii jest powiązanie kwestii fałdowania białka z jego glikozylacją, dlatego warto tutaj stosować precyzyjną terminologię.

Efekt wyłączenia SLC35A2 i SLC35A4 na ogólny poziom syntezy białek opisany w ostatnim paragrafie na stronie 107 nie jest dla mnie widoczny na rysunku 42. W linii HepG2 widoczne jest początkowe zahamowanie syntezy oraz następnie jej wzrost w czasie. W liniach SLC35A2 i SLC35A4 synteza białka w warunkach stresowych jest niższa niż w kontroli, niemniej we wszystkich punktach czasowych zdaje się kształtować na poziomie obserwowanym w komórkach typu dzikiego dopiero po 6 godzinach. Gdyby była to prawda, interpretacja danych byłaby inna niż przedstawiona przez autorkę (autorka sugeruje iż synteza białka nie rośnie po indukcji stresu w liniach SLC35A2 i SLC35A4, podczas gdy alternatywna interpretacja mówi, że synteza nie spada nigdy do tak niskiego poziomu jak w komórkach dzikich i dlatego później nie obserwuje się wzrostu). Bez systematycznej analizy densytometrycznej trudno jednak o wnioski. Podczas obrony, proszę o przedstawienie ilościowej analizy danych oraz odniesienie się na tej podstawie do powyższych uwag.

W dalszej części pracy autorka bada wpływ inhibitorów polimeryzacji tubuliny na aktywność białka SNAT2. To jedyna seria eksperymentów w całej pracy dla której nie znajdującego dobrego uzasadnienia merytorycznego – to tak jakby próbować dowiedzieć się jak działa zegarek sypiąc piasek do mechanizmu. Zegarek pełen piasku nie działa. Podobnie mechanizmy transportu komórkowego po zniszczeniu mikrotubul. Jest to konkluzja na tyle oczywista, że wg. mnie nie warta podejmowanej analizy, w miejsce której można by się skupić np. na wyjaśnieniu mechanizmów rozpoznawania prawidłowo glikozylowanych form SNAT2 kierujących ten receptor z Golgi do błony komórkowej.

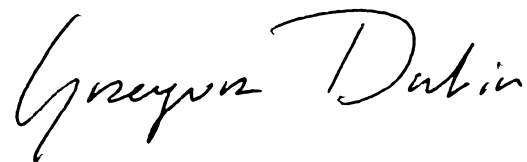
Kolejna część pracy opisuje badania wpływu stresu osmotycznego na aktywację kinazy ERK1/2. Autorka w przekonujący sposób pokazuje, iż kinaza ta jest przejściowo fosforylowana w początkowej fazie odpowiedzi na stres (rys. 49) oraz, iż proces ten jest niezależny od egzogennych czynników wzrostu (rys. 50) a także, że jest inicjowany przynajmniej na poziomie kinazy wyższego rzędu MEK1/2 (rys. 50). Autorka przedstawia przekonujące dane, iż na proces ten może wpływać fosfataza SHP2 i sugeruje powiązania z separacją LLPS. W tym drugim przypadku, występowanie procesu LLPS i jego powiązanie z aktywacją ERK1/2 jest znacznie słabiej poparte eksperymentalnie. Eksperymenty z 1,6-heksanediolem (str. 125) zdają się potwierdzać taką konkluzję jednak charakterystyczny dla całej rozprawy brak szczegółowego opracowania tematu i właściwych kontroli nie pozwala na jednoznaczne stwierdzenie. Sam fakt iż inni autorzy opisali antagonistyczny wpływ 1,6-heksanediolu na LLPS nie znaczy, że taki wpływ występuje w badanym układzie. Możemy więc jedynie stwierdzić iż traktowanie 1,6-heksanediolem wpływa na fosforylację ERK1/2, związek tej zależności z LLPS pozostaje jedynie hipotetyczny. Poza tym brak informacji w jaki sposób fosfataza SHP2 miałaby wpływać na aktywację ERK1/2?

Na tym etapie pracy autorka próbuje wpleść w narrację białko SNAT2 (np. str. 126), co jednak wg. mnie czyi zbyt wcześnie. Na przywołanej stronie autorka stwierdza np. „Utrzymująca się fosforylacja kinazy ERK1/2 przy wyższej intensywności stresu (600mOsm i 700mOsm) – w warunkach pozbawionych komponentu adaptacyjnego SNAT2 sugeruje, że dostarczone do komórki podczas fazy osmoadaptacji (500 mOsm, warunki indukujące SNAT2) aminokwasy mogą stanowić modulatory aktywności kinazy ERK1/2.” W stwierdzeniach zawartych w cytowanym fragmencie nie ma nieprawdy, jednak zawarcie w jednym zdaniu informacji o aktywacji kinazy ERK1/2 i białku SNAT2 sugeruje powiązanie funkcjonalne, które nie jest w żaden sposób wykazane w prowadzonych eksperymentach. Rzeczywiście „może” istnieć taki związek, jednak sugestia ta jest tak spekulatywna na opisywanym etapie prac, że w moim odczuciu nieuprawniona w części „Wyniki”. Powiązanie to można by zasugerować co najwyżej w „dyskusji”. Dopiero w dalszej części (str. 129) autorka stawia powyższe stwierdzenia jako hipotezę którą próbuje potwierdzić w badaniach. Stwierdzenie to (tym razem) postawione jako hipoteza jest jak najbardziej uzasadnione. Konkluzje wynikające z następujących eksperymentów (str. 129-133) są jednak zbyt daleko idące. Autorka pokazuje, że zmiany stężenia poliamin i aminokwasów korelują ze zmianami w fosforylacji ERK1/2, jednak związek przyczynowo-skutkowy będzie możliwy do wykazania jedynie przez wskazanie konkretnych mechanizmów czego brak w pracy. Sugerowanie bezpośredniego związku przyczynowo-skutkowego (jak np. na stronie 132: „Analiza LC-MS poziomu aminokwasów (...) wskazuje specyficzny udział kilku aminokwasów w regulacji szlaku sygnałowego kinazy ERK1/2”) jest zupełnie nieuzasadnione eksperymentalnie. Udział LLPS w całym procesie jest już całkowicie hipotetyczny, gdyż właściwie wydedukowany jedynie z analizy danych literaturowych uzyskanych w innych układach. W pracy praktycznie brak zaadresowania eksperymentalnego tematu LLPS.

Co ciekawe, pomimo szeregu nadinterpretacji w części „wyniki”, część „dyskusja” jest merytorycznie bardziej wyważona. Po usunięciu części bardziej spekulacyjnych stwierdzeń z rozdziału dotyczącego wyników, całość pracy odpowiadałaby znacznie lepiej wzorcom przyjętym w tego typu opracowaniach.

Podsumowując, praca dotyka ciekawych zagadnień globalnej regulacji procesów komórkowych w odpowiedzi na stres osmotyczny i prezentuje szereg interesujących danych eksperymentalnych. Niestety, zbyt szerokie zdefiniowanie podejmowanych zagadnień, nie pozwoliło na szczegółową analizę i wyjaśnienie żadnego z analizowanych procesów. Poruszone tematy mogą stanowić zaczątek niejednej interesującej pracy eksperymentalnej, szkoda tylko że w rozprawie nie znalazło się choć jedno szczegółowe opracowanie któregoś z nich. Pomimo tego, rozprawa stanowi wartościowe osiągnięcie badawcze definiujące kierunki w jakich mogą podążać dalsze prace zespołu, a przedstawiana w recenzji krytyka niektórych aspektów powinna zostać odczytana jedynie w sposób konstruktywny, a nie dyskredytujący wartość pracy.

W związku z powyższym, **stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Wiolety Banaszuk spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny wyniki przedstawione w rozprawie uzasadniają nadanie kandydatce stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr. Wiolety Banaszuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



prof. dr hab. Grzegorz Dubin
Kierownik Grupy Badawczej
Krystalografii Białek MCB UJ
Visiting Professor HMS, Harvard University