



Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Górską-Ponikowska
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 21.10.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz

pod tytułem

Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz pod tytułem „Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD” została wykonana pod promotorstwem dr hab. Moniki Słomińskiej-Wojewódzkiej, prof. UG z Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz liczy 153 numerowane strony i posiada typowy układ dla pracy doktorskiej. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały: **I.** Streszczenie, **II.** Wstęp teoretyczny (z podrozdziałami: Budowa Retikulum Endoplazmatycznego, Proces fałdowania białek w RER, Proces kontroli jakości białek, Substraty procesu ERAD, Rycyna – nietypowy substrat procesu ERAD), **III.** Hipoteza badawcza i cel pracy, **IV.** Materiały, **V.** Metody, **VI.** Wyniki, **VII.** Podsumowanie, **VIII.** Dyskusja, **IX.** Bibliografia. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści, skrótów oraz streszczeniami w języku polskim oraz angielskim. Rozprawa zilustrowana została przez 32 ryciny, zaś bibliografia obejmuje 88 pozycji literaturowych. Niestety, zabrakło spisu rycin oraz tabel, zaś w przypadku piśmiennictwa zdaniem recenzenta zastosowanie numeracji jako stylu cytowania znacznie ułatwiłoby czytelnikowi odnalezienie tekstu źródłowego.

Doktorantka podjęła istotny i ambitny temat badawczy jakim jest środowisko retikulum endoplazmatycznego, transport zsintezowanych białek do miejsc docelowych, a także mechanizmy regulujące transport nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów do cytozolu w celu ich proteolitycznej degradacji. To właśnie proces ERAD (ang. ER-associated degradation), który jest częścią systemu kontroli jakości fałdowania białek, stanowi główną tematykę pracy badawczej Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz. Doktorantka postawiła sobie za cel określenie w jaki sposób struktura i hydrofobowość wybranych substratów białkowych wpływają na ich rozpoznawanie i transport z ER do cytozolu, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka EDEM3 i białek z rodziny Derlin w tym procesie. Podjęła również bardzo ważny aspekt regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu izoform β -amyloidu. Wciąż poszukiwane są nowe opcje terapeutyczne i ich kombinacje mające na celu zwiększenie



efektywności terapii choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych związanych z neurotoksycznością złogów β -amyloidu. Stąd, opracowywanie nowych systemów enzymatycznych w medycynie oraz molekularnych narzędzi konstrukcji nowych leków ma kluczowe znaczenie z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Z wyżej wymienionych powodów wybór tego tematu badań przez Doktorantkę uważam za bardzo trafny i cenny.

We Wstępie teoretycznym liczącym 44 strony Doktorantka logicznie oraz konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Opisuje budowę retikulum endoplazmatycznego, kolejno proces fałdowania białek w RER i wskazując rolę białek szoku termicznego w tym procesie (strona 16).

Przy tej części pracy doktorskiej proszę Doktorantkę o uzupełnienie powiązania molekularnego i potencjalnej implikacji klinicznej pomiędzy białkami szoku termicznego a ich wpływem na agregację i konsekwentnie, toksyczność β -amyloidu.

Równocześnie, proszę o przybliżenie jak stres ER może regulować efektywność/ekspresję innych ważnych białek szoku termicznego znajdujących się poza lokalizacją ER, przykładowo mitochondrialnego Hsp60.

Należy podkreślić, że informacje we „Wstępie teoretycznym” są przedstawione w sposób klarowny, ułatwiający czytelnikowi zrozumienie tematyki badań Doktorantki. Treść tego rozdziału wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i znajomość tematu obszaru badań.

Następstwem powyższego rozdziału są postawione przez Doktorantkę hipoteza badawcza i cel pracy. Za główny cel badawczy doktorantka postawiła: „zdefiniowanie, w jaki sposób zmieniona struktura i hydrofobowość określonych substratów białkowych wpływają na ich rozpoznawanie i transport w procesie ERAD, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka EDEM3 oraz białek z rodziny Derlin w tym procesie”. Ponadto zostały wskazane cele szczegółowe niniejszej rozprawie doktorskiej:

1. Określenie wpływu nadprodukcji białka EDEM3 na cytotoksyczność i transport zmienionej strukturalnie podjednostki A rycyny (RTAP250A) z ER do cytozolu.
2. Analiza wpływu wyciszenia ekspresji genu EDEM3 na transport RTAP250A z ER do cytozolu.
3. Analiza oddziaływań białka EDEM3 z RTAP250A oraz RTA o zmienionej hydrofobowości (RTAIHF, RTADHF).
4. Zbadanie wpływu nadprodukcji białka EDEM3 na degradację różnych form β -sekreazy: BACE457, BACE457DHF – formy o obniżonej hydrofobowości oraz białka światła ER (BACE457 Δ).
5. Określenie roli białek Derlin-1 i Derlin-2 w cytotoksyczności i transporcie rycyny P250A.
6. Analiza wpływu nadprodukcji białek z rodziny Derlin na ilość nadprodukowanych form białka prekursorowego amyloidu, izoform APP695 i APP751.
7. Określenie wpływu nadprodukcji białka EDEM1 na ilość nadprodukowanych form APP751 w warunkach aktywnego działania proteosomu oraz zahamowania jego funkcji.



8. Sprawdzenie, jak nadekspresja genów EDEM2 i EDEM3 wpływa na ilość nadprodukowanych form APP751.

Zarówno hipoteza badawcza, jak i cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie i odzwierciedlają postawione przez Doktorantkę zadania do wykonania w ramach zaplanowanych badań.

Kolejny rozdział pracy, „Materiały i Metody”, jest napisany przejrzysto i starannie. Doktorantka dokładnie opisała użyte materiały, włączając skład buforów stosowanych podczas analiz.

Zatrzymując się przy punkcie 4.1.1 – linie komórkowe wykorzystywane w eksperymentach - proszę o uzasadnienie przez Doktorantkę wyboru linii HEK293 do swoich badań.

Punkt „Metody” jest napisany równie przejrzysto. Doktorantka opisuje kolejno oczyszczanie podjednostki A rycyny, transformację komórek bakteryjnych, hodowlę komórek HEK 293 oraz przygotowanie eksperymentalne lizatów do analiz, transport rycyny przez błony komórkowe, procedury western blot, PCR „pull down” oraz analizę statystyczną.

Podsumowując, rozdział „Materiały i Metody” w sposób skrupulatny i wyczerpujący opisuje całość zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, pozwalając na odtworzenie warunków i weryfikację uzyskanych wyników przez innych badaczy. Zdaniem recenzenta wybór oraz zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod i technik badawczych z dziedzin genetyki, biologii molekularnej, biologii komórki oraz biochemii jest imponujący i świadczy o ogromie poświęconej pracy oraz dużym potencjale naukowym Doktorantki.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” przedstawiony został na 45 stronach oraz podzielony na główne punkty dotyczące kolejno: „Nadprodukcja białka EDEM3 powoduje uwrażliwienie komórek HEK293 na rycynę P250A” (1); „Nadprodukcja białka EDEM3 nie wpływa na redukcję holotoksyny P250A w ER” (2); „Nadprodukcja białka EDEM3 wpływa na podwyższenie transportu podjednostki A P250A rycyny z ER do cytozolu” (3); „Nadprodukcja białka EDEM3 wpływa na podwyższenie transportu podjednostki A P250A rycyny z ER do cytozolu w warunkach inhibicji działania proteasomu” (4); „Wyciszenie ekspresji genu EDEM3 powoduje obniżenie transportu RTAP250A z ER do cytozolu” (5); „EDEM3 oddziałuje z podjednostką RTA w zależności od jej struktury drugorzędowej (RTAP250A) oraz stopnia hydrofobowości (RTAIHF i RTADHF)” (6); „Nadprodukcja białka EDEM3 w różny sposób wpływa na stabilność BACE457, BACE457DHF i BACE457Δ” (7); „Nadprodukcja białka Derlin-1 w komórkach HEK293 prawie dwukrotnie zwiększa toksyczność RTA P250A” (8); „Podwyższona ilość białka Derlin-1 wpływa na prawie dwukrotnie podwyższenie transportu RTAP250A z ER do cytozolu” (9); „Nadprodukcja białka Derlin-2 nie wpływa na cytotoxyczność rycyny P250A” (10); „Podwyższona ilość białka Derlin-2 w komórkach HEK293 nie wpływa na transport RTAP250A z ER do cytozolu” (11); „Białka z rodziny Derlin w różny sposób wpływają na ilość izoform białka APP w komórkach HEK293” (12); „Nadprodukcja białka EDEM1 wpływa na obniżenie ilości form nadprodukowanych białka APP751 w komórkach HEK293” (13); „Nadprodukcja białek EDEM2 i EDEM3 wpływa na obniżenie ilości form nadprodukowanych białka APP751 w komórkach HEK293” (14).

W szeregu prac eksperymentalnych Doktorantka uzupełniła wiedzę na temat procesu ERAD jako kluczowego elementu systemu kontroli jakości białek i regulacji cytotoxyczności wobec komórek



normotypowych. W toku doświadczeń Doktorantka rzetelnie określiła wpływ struktury i hydrofobowości wybranych substratów białkowych na ich rozpoznawanie i transport w procesie ERAD, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka EDEM3 oraz białek z rodziny Derlin. Co ważne, wyniki Doktorantki wykazały, że nadprodukcja EDEM3 prowadzi do prawie dwukrotnego podwyższenia wrażliwości komórek HEK293 na działanie toksyny P250A. Wpływa również na zwiększenie efektywności jej transportu z ER do cytozolu. Co istotne, nadprodukcja EDEM3 nie ma wpływu na hamowanie syntezy białek przez rycynę dzikiego typu i jej transport z ER do cytozolu. *Jakie są według Doktorantki przyczyny tego zjawiska i możliwe implikacje kliniczne?*

Autorka rozprawy porównała trzy warianty β -sekreazy aby zweryfikować, wpływ zmian ich struktury i hydrofobowości na rozpoznanie i degradację substratów procesu ERAD. Doktorantka wykonała badania określające stopień oddziaływań EDEM3 z różnymi formami podjednostki A rycyny, wykazując, że zarówno struktura, jaki i stopień hydrofobowości białek mogą mieć znaczenie w ich rozpoznawaniu i kierowaniu do degradacji przez EDEM3. EDEM1 odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu niedojrzałej formy APP695, promując jej degradację poprzez szlak ERAD. W swojej pracy doktorskiej Pani mgr Hanna Sominka-Pierzchlewicz wykazała znaczący spadek ilości nadprodukowanej niedojrzałej formy APP751 i dojrzałej formy APP695 oraz nadprodukowanej dojrzałej formy APP751 pod wpływem nadprodukcji EDEM1. Przeprowadzone badania dostarczają istotnych dowodów na rolę białka EDEM1 w regulacji poziomu nadprodukowanej izoformy APP751 w komórkach HEK293. Mechanizm ten jest szczególnie ważny w kontekście patogenezy choroby Alzheimera, gdzie akumulacja β -amyloidu, produktu cięcia proteolitycznego APP, odgrywa centralną rolę w rozwoju tego schorzenia. *Tu jednak nasuwa się pytanie recenzenta, czy wybór modelu komórkowego choroby Alzheimera nie byłby bardziej odpowiedni, aby potwierdzić hipotezę Doktorantki? Czy Doktorantka mogłaby wymienić komórkowe i zwierzęce modele choroby Alzheimera, które mogłyby być zastosowane w jej badaniach? Oraz kolejno, jak Doktorantka wskazałaby użyteczność kliniczną uzyskanych przez siebie wyników?*

Recenzent ma również drobną uwagę dotyczącą przedstawienia wyników badania poziomu białek. Warto przedstawić stosunek zmiany krotności (fold change) względem komórek kontrolnych, to ułatwia analizę wyników. Ponadto, obok wyników przedstawiających prężki białek warto przedstawić marker lub chociażby wskazać ich masę molekularną.

Uzyskane wyniki Doktorantki zostały podsumowane rozdziałem, a kolejno skonfrontowane z aktualną literaturą naukową w rozdziale Dyskusja.

Zaprezentowana przez Doktorantkę rozprawa doktorska w sposób logiczny i konsekwentny odzwierciedla kontekst badań i potwierdza dużą znajomość problematyki regulacji struktury i hydrofobowości substratów ERAD w ich rozpoznawaniu i kierowaniu do degradacji, zwłaszcza przez białko EDEM3 oraz białka z rodziny Derlin. Doktorantka na substancję modelową wybrała rycynę, która jest bardzo dobrym modelem w badaniu transportu białek z ER do cytozolu. Wyniki te uzupełniają wiedzę na temat molekularnych mechanizmów procesu ERAD. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazujące na rolę EDEM3, białek Derlin, a także innych regulatorów ERAD w rozpoznawaniu substratów białkowych. Są ponadto również bardzo istotne klinicznie m.in. w zakresie chorób neurodegeneracyjnych. W swojej pracy doktorskiej Doktorantka nie ustrzegła się jednak błędów



edytorskich, m.in. brakuje numeracji niektórych punktów. Te uwagi jednak nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno merytoryczna jak i metodyczna strona rozprawy doktorskiej zasługuje na uznanie.

Rozprawa doktorska Pani **mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz** pod tytułem „**Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD**” spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn.zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1669 z późn. zm).

Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoki poziom metodyczny i merytoryczny pracy, oraz implikacje kliniczne wynikające z uzyskanych wyników badań, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Katedra i Zakład Chemii Medycznej
prof. dr hab. Magdalena Górską-Ponikowską

Kierownik