

**FACULTY OF BIOTECHNOLOGY**

DEPARTMENT OF PROTEIN ENGINEERING

ul. Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław | Poland

Tel. +48 71 375 28 89

[www.biotech.uni.wroc.pl](http://www.biotech.uni.wroc.pl)

dr hab. Małgorzata Zakrzewska, prof. UWr

Wrocław, 21 października 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz z tytułem magistra  
„Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek  
związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz, została przygotowana w Katedra Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pani dr hab. Moniki Słomińskiej-Wojewódzkiej, prof. UG i obejmowała prace badawcze realizowane w ramach projektu NCN OPUS nr 2015/19/B/NZ3/03266. Przedmiotem badań było zweryfikowanie czy zmieniona struktura i hydrofobowość określonych substratów białkowych wpływa na ich rozpoznanie, transport i degradację w procesie ERAD. Tematykę badawczą uważam za niezwykle ciekawą i ważną, w związku z istotnym znaczeniem ERAD w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych i lizosomalnych, a realizacja pracy pod opieką doświadczonego promotora, specjalizującego się w badaniach nad retrotranslokacją i wewnątrzkomórkowym transportem zapewniła zastosowanie niezbędnych metod i prawidłowego zaplanowania prac eksperymentalnych.

Rozprawa doktorska mgr Sominki-Pierzchlewicz jest napisana w języku polskim, liczy 153 stron, podzielona jest na dziewięć rozdziałów, które stanowią: *Streszczenie, Wstęp, Hipoteza badawcza, opis zastosowanych materiałów i metod, prezentacja uzyskanych wyników, Podsumowanie, Dyskusja oraz spis cytowanej literatury* (ponad 230 pozycji). Ponadto w pracy zawarto wykaz skrótów stosowanych w pracy oraz dorobek publikacyjny Doktorantki.

We *Wstępie* Doktorantka szczegółowo omówiła najważniejsze zagadnienia dotyczące procesu degradacji polipeptydów związanego z błonami śródkomórkowymi. Zawarła w nim wyczerpujące informacje na temat budowy retikulum endoplazmatycznego. Przedstawiała proces zwijania białek w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej, a także przybliżyła białka zaangażowane w ścieżkę ERAD. W kolejnym podrozdziałach skupiła się na wybranych

substratach ERAD, opisując białko prekursorowe amyloidu (APP) oraz  $\beta$ -sekretazę. Cały rozdział napisany jest kompetentnie, dobrze wprowadza w poszczególne aspekty rozprawy doktorskiej i świadczy o znajomości tematu przez Doktorantkę. Niemniej jednak poprosiłabym Doktorantkę o przybliżenie, w trakcie publicznej rozprawy, mechanizmu endocytozy rycyny, roli poszczególnych receptorów w tym procesie, a także wyjaśnienie w jaki sposób różne szlaki internalizacji wpływają na jej wewnątrzkomórkowy transport. Ponadto prosiłabym o przedyskutowanie możliwości zastosowania rycyny w lekach przeciwnowotworowych typu ADC. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że immunotoksyny nie są szeroko wykorzystywane, gdyż obecnie są jedną z najprężniej rozwijających się form terapii celowanych.

Hipoteza badawcza i główny cel pracy zostały precyzyjnie określone. Zadaniem Doktorantki było zweryfikowanie jak zmiany w strukturze drugorzędowej oraz hydrofobowości substratu wpływają na ich transport i degradację w procesie ERAD w kontekście wybranych elementów tego szlaku: białka EDEM3 oraz białek z rodziny Derlin. Wyszczególniono osiem szczegółowych celów badawczych, które zostały w pełni przez Doktorantkę zrealizowane.

W rozdziałach *Materiały* i *Metody* szczegółowo opisano wykorzystane w pracy odczynniki, bufony, komercyjne zestawy oraz zastosowane techniki z zakresu biochemii oraz biologii komórki. Rozdział ten pokazuje, że Doktorantka rzetelnie opanowała warsztat badawczy i swobodnie posługuje się zaawansowanymi metodami eksperymentalnymi. Mam kilka drobnych uwag i pytań dotyczących tej części pracy. W rozdziale *Materiały* dobrze byłoby podać źródło pochodzenia wszystkich szczepów bakteryjnych (a nie tylko odnośnik literaturowy). W moim odczuciu nadawanie osobnych numerów podrozdziałów dla poszczególnych odczynników nie jest potrzebne. Warto byłoby natomiast podawać składy buforów konsekwentnie w formie stężeń molowych, zawrzeć krótki opis stosowanych kolumn chromatograficznych w języku polskim, a wyszczególniając używane przeciwciała podać ich numery katalogowe, gdyż przedstawiony opis nie zawsze jest jednoznaczny. W tej części pracy zabrakło mi też listy używanego sprzętu laboratoryjnego wraz z informacjami dotyczącymi producentów. Odbiór rozdziału *Metody* ułatwiłoby także pogrupowanie poszczególnych technik pod względem typu eksperymentu, np. opisy oczyszczania wszystkich

rekombinowanych białek mógłby znaleźć się w jednym podrozdziale. Rezultaty analiz jakości RNA sugerowałabym umieścić w sekcji *Wyniki*, a skład mieszaniny reakcyjnej PCR powinien zostać przedstawiony w formie stężeń molowych (nie zaś objętości). Prosiłabym o wyjaśnienie w jaki sposób wyznaczane było stężenie rycyny i dlaczego nie zastosowano metody spektrofotometrycznej. Ciekawi mnie również, dlaczego do przygotowania żelu agarozowego stosowano wybielacz Ace. W rozdziale dotyczącym analizy statystycznej pojawia się stwierdzenie, że „wyniki doświadczeń zostały przedstawione jako wartości z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń biologicznych”, brak jednak informacji, ile powtórzeń technicznych wykonanych zostało w pojedynczych eksperymentach (np. w teście inkorporacji znakowanej radioaktywnie leucyny). Proszę również o doprecyzowanie jaki rodzaj testu t-Studenta stosowano. Czy test ten był jednostronny/dwustronny, parowany/nieparowany? Czy dla wszystkich eksperymentów stosowano ten sam rodzaj testu?

Rozdział poświęcony wynikom zawiera szereg wartościowych danych. Doktorantka wykazała, że zarówno struktura, jak i hydrofobowość substratów ERAD ma istotne znaczenie dla procesu degradacji, wpływając na ich rozpoznawanie przez białko EDEM3 oraz białka z rodziny Derlin. Nadprodukcja białka EDEM3 w komórkach HEK293 zwiększa efektywność transportu podjednostki A rycyny (RTA<sub>P250A</sub>) o zmodyfikowanej strukturze drugorzędowej z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu, prowadząc do jej zwiększonej cytotoksyczności. Rolę EDEM3 w transporcie i degradacji RTA<sub>P250A</sub> Doktorantka potwierdziła również poprzez wyciszenie ekspresji genu EDEM3 oraz zastosowanie inhibitora proteasomu. Wykazała także, że EDEM3 preferencyjnie oddziałuje z wariantami RTA o zmienionej (względem typu dzikiego) hydrofobowości. Ponadto pokazała, że również białko Derlin-1 wywołuje wzrost cytotoksyczności RTA<sub>P250A</sub>, poprzez zwiększenie efektywności transportu z ER do cytozolu. Co ciekawe, poziom Derlin-2 nie wpływa na aktywność RTA<sub>P250A</sub> w komórkach. Następnie mgr Sominka-Pierzchlewicz pokazała, że nadprodukcja białka EDEM3 znacząco przyspiesza degradację również zmodyfikowanych wariantów białka BACE457 (BACE<sub>457Δ</sub> oraz BACE<sub>457DHF</sub>), co potwierdza znaczenie hydrofobowości substratów ERAD dla ich efektywnej degradacji proteasomalnej. Wykorzystując izoformy kolejnego substratu ERAD, białka APP, Doktorantka wykazała, że poziom białka Derlin-3, w przeciwieństwie do Derlin-1 i Derlin-2, wpływa na

efektywność degradacji izoformy APP<sub>695</sub>. W przypadku izoformy APP<sub>751</sub> zaobserwowała ona, że nadprodukcja białek EDEM powoduje obniżenie jej ilości w komórkach. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę oceniam wysoko i mam nadzieję, że przyczynią się lepszemu zrozumienia mechanizmów związanych z procesem ERAD, które wydaje się krytyczne dla projektowania efektywnych terapii np. chorób neurodegeneracyjnych czy lizosomalnych.

Rozdział *Podsumowanie* zawiera jasno sformułowane końcowe wnioski, które znajdują potwierdzenie w zaprezentowanych wynikach doświadczeń. *Dyskusja* jest krytycznym porównaniem uzyskanych przez Doktorantkę wyników, a także wcześniejszych prac przeprowadzonych w zespole, z najnowszymi danymi literaturowymi. Zabrakło mi w tej części pracy jedynie propozycji kierunków dalszych badań.

Nasuwa mi się kilka zagadnień i kwestii, o omówienie których prosiłabym Doktorantkę w trakcie publicznej rozprawy:

1. Proszę o uzasadnienie braku zastosowania w charakterze kontroli, typu dzikiego rycyny w eksperymentach przedstawionych w rozdziale 6.1, 6.8, 6.9 oraz 6.10.
2. Jaka była istotność statystyczna oznaczona jako „\*\*\*”? 0,001 czy 0,0001?
3. Czy na Ryc. 14 brak słupka błędu wynika z jego bardzo małej wartości?
4. Proszę o zweryfikowanie podpisu osi Y na wykresach przedstawionych na Rys. 15B, 15D, 16B, 18B, 24B i 26B.
5. Proszę o zweryfikowanie podpisu WB przedstawionego na Rys. 16A.
6. W pracy stosowano zmutowaną formę RTA, RTA<sub>P250A</sub>. Proszę o informację skąd wiadomo, iż białko to ma zmienioną strukturę drugorzędową.
7. W jaki sposób określana była hydrofobowość wariantów RTA oraz BACE?
8. Czy wyniki przedstawione na Rys. 28, to kontrola nadprodukcji Derlin dla eksperymentu, którego wyniki przedstawiono na Rys. 29, czy też jest to niezależny eksperyment?

Praca jest napisana starannie. Autorka nie ustrzegła się jednak kilku błędów interpunkcyjnych, typograficznych i stylistycznych (szczególnie w *Streszczeniu*). W całej pracy bardzo nadużywany jest skrót „m.in.”. Określenie „fałdowanie białek”, będące kalką z języka angielskiego, powinno być zastąpione przez „zwijanie białek”. W *Wykazie skrótów* brak

konsekwencji w rozwinięciach, czasami pojawiają się nazwy polskie, czasami tylko angielskie, czasami obie wersje językowe. Nie wszystkie rysunki są spójne pod względem graficznym (brak konsekwencji w doborze i wielkości czcionek), a na końcach linii pojawiają się pojedyncze litery. W pracy znalazło się kilka niefortunnych sformułowań (np. „RTA składa się z 267 reszt aminokwasowych, tworzących 3 główne struktury białka”, „RTB składa się z 262 reszt aminokwasowych, tworzących dwa identyczne, homologiczne białka”, „struktura utworzona na podstawie sekwencji dostępnej w bazie danych PDB”, „Tris base”, „% w stosunku do kontroli”, „plazmid niosący gen kodujący”). Pragnę jednak podkreślić, że są to nieznaczące uchybienia o charakterze edytorskim, niemające wpływu na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz zatytułowanej „Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD” jest wysoce pozytywna. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki uważam za niezwykle oryginalne i wartościowe. Wnoszą one nową wiedzę w obszar badań nad procesem ERAD, otwierając nowe możliwości terapeutyczne. W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Hanny Sominki-Pierzchlewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, iż przedstawiona rozprawa reprezentuje wysoki poziom naukowy i spełnia wymogi określone w 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 r. poz. 1669 ze zm.), stawiane rozprawom doktorskim.

*Matygorata Zakrzewska*