

Wrocław dnia 26 maja 2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Michalczyk pt: "Próba określenia mechanizmu agregacji spektryny oraz fizjologicznej roli tego zjawiska" z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Komórki organizmu mogą ginąć z powodu różnych rodzajów śmierci: apoptozy, autofagii, nekrozy, nekroptozy, piroptozy itp. Do apoptozy może dochodzić w wyniku działania czynników zewnętrznych fizjologicznych w czasie rozwoju organów, a także patologicznych jak np. zapalenie, jak również wskutek działania czynników wewnątrzkomórkowych, które uniemożliwiają dalsze jej funkcjonowanie. Szlaki zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe inicjujące apoptozę różnią się między sobą, a uczestniczą w nich błony komórkowe, cytoszkielet i rozliczne enzymy. W czasie badań wpływu leczenia cytostatycznego na cytoszkielet komórek nowotworów hematologicznych prowadzone przez Zakład Cytobiochemii Uniwersytetu Wrocławskiego i Klinikę Hematologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wykazano, że spektryna w tych komórkach agreguje podczas indukcji apoptozy przez cytostatyki.

Wyjaśnieniem ww spostrzeżenia zajęła się doktorantka badając mechanizm powstawania agregacji spektryny na limfoidalnej linii białaczkowej Jurkat T. Białka nierozpuszczalne w Tritonie X-100, w tym spektrynę ilościowo badała przy pomocy techniki Western Blotting. Jakościowo metodą immunofluorescencji przy pomocy odpowiednich przeciwciał badała rozmieszczenie enzymów i białek w komórce. Apoptozę zewnątrzpochodną (szlak receptorowy) wywoływała przy pomocy liganda TRAIL, a wewnątrzpochodną (szlak mitochondrialny) nadtlaniem wodoru. Ponieważ agregacja spektryny pojawia się wcześniej po inicjacji, a przed aktywacją kaspazy 8 dlatego zbadała proces agregacji w linii z obniżoną ekspresją FADD. W linii tej dodatkowo wykazała, że PKC teta lokalizuje się w błonie komórkowej w przeciwieństwie do lokalizacji cytoplazmatycznej w linii wyjściowej. W tej linii z obniżoną ekspresją FADD agregacja spektryny pojawiała się później.

Następnie badała wpływ PKC teta na indukcję agregacji spektryny używając do tego linii Jurkat T z obniżoną ekspresją tego enzymu. Wykazała, że kinaza ta ma charakter hamujący na agregację. Spektryna w agregatach jak wykazano, ulega fosforylacji dlatego pojawiło się pytanie, czy ona ma wpływ na jej powstawanie, dlatego transfekowano komórki badanej linii fragmentami DNA kodującymi fragment C-końcowy spektryny ulegający fosforylacji. Ten etap doświadczenia wykazał niezależność agregacji spektryny od fosforylacji.

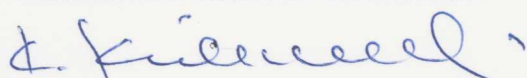
Kolejnym pytaniem jest wpływ spektryny na inicjację apoptozy. W tym celu doktorantka wykorzystwała linię Jurkat T z obniżoną ekspresją spektryny alfa, w której aktywność kaspazy 8

była wyższa a jej forma prekursorowa gromadzi się głównie w strefie błonowej, gdzie również występuje wimentyna podczas gdy w kontrolnej linii forma prekursorowa kaspazy 8 znajduje się w strefie cytoplazmy i błony. Tak więc obniżone stężenie spektryny przyspiesza proces apoptozy potwierdzony dodatkowo ekspresją fosfatydylo-seryny w błonie komórkowej. Destabilizacja aktyny nie miała wpływu na rozmieszczenie prekursora kaspazy 8.

Doktorantka uzyskane wyniki szczegółowo i wyczerpująco zaanalizowała w dyskusji przedstawiając na końcu model indukcji agregacji spektryny w trakcie apoptozy opierający się na własnych badaniach z wnioskami, które zawarłem w streszczeniu rozprawy. Na temat udziału cytoszkieletu w apoptozie nie ma wiele danych, a badania doktorantki dostarczają ich. Na podkreślenie zasługuje użycie przez doktorantkę linii komórkowych Jurakat T z obniżoną ekspresją PKC teta czy spektryny dla udowodnienia założonych badań.

Praca napisana jasnym językiem ze znawstwem tematu. Nie mam uwag co do edycji doktoratu. Założone cele doktorantka zrealizowała. Rozprawa doktorska odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18.03.2011r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych i dorobek naukowy uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemii. Dlatego przedkładam Pani Dziekan Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Michalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr. hab. Kazimierz Kuliczkowski



Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku

Uniwersytet Medyczny

Wybrzeże L.Pasteura 4

50-367 Wrocław