

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Michalczyk
"Próba określenia mechanizmu agregacji spektryny oraz fizjologicznej roli tego
zjawiska"**

Spektryna jest znana głównie jako białko szkieletu błonowego i nie była dotychczas postrzegana jako element procesu apoptozy, lecz jako białko ulegające proteolizie katalizowanej przez kaspazy – będące egzekutorami programowanej śmierci komórki.

Jednakże, w roku 2005 zespół pod kierunkiem Prof. Sikorskiego zaobserwował podczas indukcji apoptozy mieszaniną cytostatyków (FMD) w komórkach od pacjentów z chłoniakiem oraz białaczką powstawanie agregatów białkowych zawierających głównie spektrynę oraz białka towarzyszące m.in. kinazę PKC θ . Zwróciło to uwagę na możliwość udziału spektryny oraz kinazy we wczesnym etapie apoptozy. Badania te były kontynuowane na modelu komórkowym: HL60 oraz Jurkat T i opublikowane w 2010 roku potwierdzając redystrybucję spektryny wraz z PKC θ we wczesnych etapach apoptozy oraz sugerując rolę PKC θ w regulacji tego procesu. Ponieważ mechanizm molekularny leżący u podstaw tego zjawiskach pozostawał niepoznany, w przedstawionej pracy autorka podjęła się próby jego wyjaśnienia.

Oceniana praca ma układ przyjęty dla tego typu opracowań. We Wstępie liczącym 15 stron Doktorantka, wykazując się dobrą znajomością tematu, omówiła budowę i funkcje spektryny, oraz kinaz białkowych C, jak również główne szlaki indukcji apoptozy poświęcając najwięcej uwagi spektrynie. Obszerne informacje na temat procesu apoptozy zostały skomasowane na trzech stronach i stanowią lekturę trudną do przeczytania.

Rozdział Materiały i Metody opisuje metody, którymi posługiwała się Autorka w czasie realizacji pracy. Jest on przedstawiony zwięźle i w sposób uporządkowany i nie budzi zastrzeżeń.

Cel Pracy, którym było wyjaśnienie roli fizjologicznej, podłoża molekularnego i sposobu regulacji tworzących się agregatów apoptotycznych został jasno i szczegółowo przedstawiony. Autorka zadając kolejno pytania i opisując stosowane metody odpowiedzi na nie stworzyła interesującą historię badań. W rozdziale tym znalazły się też staranne schematy wyjaśniające przypuszczalne mechanizmy badanych zjawisk. Jakkolwiek bardzo doceniam sposób przygotowania rycin, widziałabym je raczej w rozdziale Dyskusja, który dyskutuje

otrzymane i znane już recenzentowi wyniki pozwalając ustosunkować się do ich interpretacji zawartej na schematach.

W rozdziale Wyniki autorka opisuje realizację poszczególnych zadań badawczych poprzez zadawanie kolejnych pytań i udzielając na nie odpowiedzi. Punktem wyjścia do badań będących podstawą pracy doktorskiej była wcześniejsza obserwacja agregatów apoptotycznych tworzących skupiska pod błoną komórkową i nierozpuszczalnych w zimnym roztworze detergentu. Metody obserwacji obejmowały technikę Western blottingu i immunofluorescencję oraz komórki Jurkat T jako model badawczy.

Pierwsze pytanie dotyczyło zależności agregacji spektryny od drogi indukcji apoptozy. W tym celu apoptozę aktywowano przy użyciu dwóch induktorów: szlaku receptorowego (białko TRAIL) oraz szlaku mitochondrialnego (nadtlenek wodoru). Stwierdzono, że agregacja spektryny następuje po indukcji apoptozy oboma szlakami, jednakże nieznacznie szybciej w przypadku białka TRAIL i tej drogi indukcji używano w dalszych eksperymentach. Stwierdzono ponadto, że kinaza białkowa PKC θ lokalizuje się w agregatach spektrynowych indukowanych białkiem TRAIL.

Drugim pytaniem było ustalenie, który ze znanych etapów receptorowego szlaku indukcji apoptozy ma związek z procesem tworzenia się agregatów spektrynowych. W tym celu uzyskano stabilną linię komórek Jurkat T z obniżoną o 50% genu kodującego białko adaptorowe FADD. Ustalono, że komórki te okazały się mniej wrażliwe na apoptozę indukowaną TRAIL, a agregacja spektryny w tych komórkach była opóźniona. Ponadto, stwierdzono, że kinaza białkowa PKC θ lokalizuje się w tych komórkach głównie w obrębie błony komórkowej, w porównaniu z cytozolową lokalizacją komórek linii wyjściowej. Zaproponowano, że może to sugerować udział białka FADD w tworzeniu agregatów spektrynowych.

Trzecim pytaniem było zbadanie relacji między kinazą PKC θ , a agregacją spektryny. Wyprowadzona linia o obniżonym poziomie ekspresji genu kodującego PKC θ wykazywała zwiększony odsetek komórek apoptotycznych oraz wyższą aktywność kaspazy 8 jak również szybszą agregację spektryny w porównaniu do komórek kontrolnych. Wykazano, że spektryna w agregatach ulega fosforylacji. Powstało kolejne pytanie, czy fosforylacja spektryny nie jest sygnałem do jej agregacji? W komórkach Jurkat T stransfekowanych C-końcowym fragmentem spektryny zawierającym miejsca fosforylacji zaobserwowano późniejsze przechodzenie PKC θ do błony po aktywacji TRAIL i zwiększoną agregację spektryny endogennej. Można zatem było przypuszczać, że kinaza oddziałując ze spektryną

pełni funkcję ochronną opóźniając powstawanie proapoptotycznych agregatów spektrynowych.

Ostatnim pytaniem był wpływ samej spektryny na proces apoptozy. W otrzymanej stabilnej linii komórkowej *Spantan1-KD* z obniżoną ekspresją genu kodującego spektrynę α wykazano, że ilość aktywnej formy kaspazy 8 jest wyższa w porównaniu z kontrolą. Może się to przekładać na przyspieszenie procesu apoptozy w komórkach z obniżoną ekspresją spektryny. Ponadto stwierdzono, że prekursor kaspazy 8 nie jest związany za agregatami spektrynowymi, a jego ilość wzrasta w tych komórkach w obrębie błony w towarzystwie wimentyny i białka 4.1. Może to sugerować, że spektryna i jej agregaty mogą być regulatorem oddziaływania prokaspazy 8 z wimentyną.

Rozdział Wyniki liczy 30 stron jest dobrze i jasno napisany i zawiera wyczerpująco opisane ryciny zawierające analizy z użyciem metody immunoblottingu oraz fotografie z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Uważam ten rozdział za obszerny i zawierający dużą ilość wyników. Tok myślowy świadczy o dobrym zorientowaniu w temacie i umiejętności jego konsekwentnej realizacji oraz sprawności laboratoryjnej. Część wyników z zastosowaniem metody Western blottingu mogłaby jednak być nieco staranniejsza co umożliwiłoby łatwiejszą interpretację wyników.

W Dyskusji, liczącej około 10 stron, Autorka podsumowuje i interpretuje otrzymane wyniki, wykazując się dużą wiedzą. Dyskutuje poruszając wiele wątków i proponuje możliwą interpretację obserwowanych zjawisk. Dyskusja zawiera wiele sugestii, ale jest prowadzona z dużą ostrożnością. Jest zakończona propozycją prawdopodobnego modelu udziału agregatów spektrynowych w wiązaniu prokaspazy 8 przy udziale wimentyny i białka 4.1 i tym samym przyspieszenia procesu apoptozy.

Język pracy jest poprawny i płynny, umożliwiający sprawne czytanie. Nie obyło się niestety bez wielu błędów literowych nie wpływających jednakże na walory merytoryczne pracy.

Pani mgr Izabela Michalczyk przedstawiła otrzymane wyniki wyczerpująco, a dyskusję przeprowadziła w sposób świadczący o dobrej znajomości tematu. Jednakże z obowiązku recenzenta chciałbym podzielić się kilkoma uwagami i proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich.

1. Zastanowił mnie wybór indukcji apoptozy przy pomocy białka TRAIL w komórkach lini Jurkat T, zamiast na przykład TNF α , tym bardziej, że TRAIL jest znanym

induktorem szlaku receptorowego apoptozy w komórkach nerwowych, a nie limfocytach. Z czego wynikała taka decyzja?

2. Wykazanie, że PKC θ pełni funkcję ochronną, podczas gdy białko FADD jest induktorem agregacji spektryny uważam za najistotniejsze osiągnięcie pracy. Wykazanie bezpośredniego związku agregacji spektryny z apoptozą traktowałabym z dużą ostrożnością, ponieważ nawet w komórkach *Spantani1-KD* z obniżoną zawartością spektryny zauważalne jest jedynie jej istotne opóźnienie, w stosunku do komórek kontrolnych, które po 720 min się prawie wyrównuje i wynosi jedynie 15%.
3. Założenie, że spektryna stanowić może szkielet dla prokaspazy 8 niestety nie potwierdziło się. Wymagało to dalszego poszukiwania innych białek szkieletu komórkowego zaangażowanych w wiązanie prokaspazy 8. Wnioski dotyczące roli wimentyny i białka 4.1, jako rusztowania dla prokaspazy 8, oparte jedynie na immunofluorescencji, jakkolwiek obiecujące, są jeszcze za słabo udokumentowane.
4. Sądzę, że dalsza kontynuacja pracy nad tym interesującym problemem z zastosowaniem nowych technik molekularnych, jak CRISPR/Cas9, umożliwić może autorom jednoznaczną odpowiedź na postawione w tytule pracy pytanie o fizjologiczną rolę agregacji spektryny w apoptozie i tym samym publikację nowatorskich wyników w czasopiśmie o wyższym współczynniku wpływu.

Pracę doktorską mgr Izabeli Michalczyk oceniam wysoko. Jej wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Folia Histochemica Cytobiologica*. Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Izabeli Michalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 25.05.2017


dr hab. Ewa Jaśkiewicz