

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Smejda pt. „Molecular characterization of human KTI12”

Białka stanowią około 25-30% masy większości komórek zwierzęcych. Uważa się, że w każdym momencie w komórkach znajduje się około dziesięciu tysięcy różnego typu białek, a ich stężenie waha się od kilku milionów do pojedynczych cząsteczek na komórkę.

O ile proces syntezy nowego łańcucha polipeptydowego został już dosyć dobrze wyjaśniony, o tyle mechanizmy odpowiedzialne za odpowiednie tempo produkcji nowych cząsteczek białka są ciągle dalekie od pełnego poznania.

Jednym z takich mechanizmów regulujących syntezę nowego łańcuch polipeptydowego jest modyfikacja nukleozydów transferowego RNA polegająca na specyficznym, kontrolowanym na drodze enzymatycznej, przyłączeniu do różnych fragmentów tRNA szeregu cząsteczek chemicznych (takich jak reszta fosforanowa, metylowa, acetylowa i wielu innych). Owe modyfikacje następują w odpowiedzi na zmieniające się warunki metaboliczne i sygnalizację międzykomórkową, ale mogą być także efektem różnych stanów patologicznych.

Wydaje się, że jednym z najistotniejszych fizjologicznie sposobów regulacji/modyfikacji cząsteczki tRNA może być mechanizm modyfikacji nukleozydów antykodonu. Proces ten jest regulowany poprzez aktywność enzymatyczną kompleksu białkowego Elongator. Kompleksu, którego poznanie zawdzięczmy w dużej mierze badaniom grupy, w której Doktorantka wykonywała swoje badania podczas studiów doktoranckich.

Doktorantka podczas pracy doktorskiej skupiła się na zbadaniu właściwości ludzkiej formy białka regulatorowego kompleksu Elongator, białka KTI12 (Toxin Insensitive 12). Badania przeprowadzone przez zespół profesora Sebastiana Glatta wykazały bowiem, że białko Kti12 pochodzące z grzybów (*Chaetomium thermophilum*) jest strukturalnie zbliżone do białka PSTK (prokariotyczna RNA-zależna kinaza O-phosphoserylowa, O-phosphoseryl-tRNA kinase, ekspresjonowana jednak także przez komórki eukariontów, w tym *Homo sapiens*) i jest zaangażowane w biosyntezę selenocysteiny poprzez regulację aktywności Elongatora. Co więcej, istnieje szereg doniesień pokazujących, że mutacje różnych białek tworzących kompleks Elongator są powiązane z wieloma schorzeniami (PMID: 33658722).

Tak więc tematem badawczym Doktorantki było sprawdzenie, czy ludzka forma białka Kti12, KTI12, wykazuje podobne właściwości do białka PSTK i czy zaburzenie prawidłowej funkcji/stężenia białka KTI12 będzie miało odzwierciedlenie w zmianie parametrów morfologicznych oraz fizjologicznych i biochemicznych komórki. Zadaniem wynikającym z powyższego planu było również poszukiwanie nowych partnerów białkowych oddziałujących z KTI12 w ludzkich komórkach nowotworowych (PC-3 i HEK293T) i nietransformowanych nowotworowo (fibroblasty linii BJ).

W trakcie swoich badań Doktorantka z powodzeniem użyła szeregu technik biochemicznych, biologii molekularnej i komórkowej, co wysoko świadczy o jej zdolnościach eksperymentalnych.

Potwierdziła Ona, iż tak jak w przypadku białka PSTK i Kti12, białko KTI12 wykazuje aktywność ATPazową, co raczej nie było zaskoczeniem. Doktorantka odkryła jednak, że regulacja aktywności obu białek przez tRNA jest inna.

Badając partnerów KTI12, Doktorantka przedstawiła przekonujące dowody, że komórkowym partnerem białka są przede wszystkim białka Elongatora oraz, być może, białko MINDY-3. Co ciekawe, wśród potencjalnych partnerów białka KTI12 (techniki co-immunoprecypitacji i BioID2 pokazują oczywiście bardzo wiele hipotetycznych partnerów) nie występowały białka, o których wiadomo, że oddziałują z PSTK. Wskazuje to na inne mechanizmy regulacji aktywności Elongatora, co Doktorantka dosyć wyczerpująco dyskutuje.

Największym „niepowodzeniem”, które jest zarazem sukcesem badawczym, było odkrycie przez Doktorantkę, że obniżenie ekspresji KTI12 nie wpływa na podstawowe

parametry komórkowe: proliferację, żywotność i migrację, chociaż znacząco obniża poziom karbamoylometylourydyny w tRNA^{Arg} i tRNA^{Lys}. Odkrycie to niewątpliwie komplikuje układ badany, ale biorąc pod uwagę ilość chorób związanych z nieprawidłowym działaniem KTI12, powoduje że obiekt badawczy staje się jeszcze ciekawszym.

W tym przypadku można się jednak zastanawiać, czy brak obserwowalnego wpływu na komórki może nie wynikać z wyboru modelu komórkowego? Doktorantka sprawdzała efekty wyciszenia KTI12 w wyselekcjonowanych liniach komórek nowotworów oraz fibroblastów, która jednakże charakteryzują się dosyć specyficzną biologią (np. zdolność do bardzo dużej liczby podziałów, chyba ponad 70). Skoro wyciszenie ELP3 dawało wspaniałe efekty, to może w badanych liniach KTI12 nie pełni z jakiś powodów swojej kanonicznej funkcji regulatora Elongatora?

Swoją drogą, efekty wyciszenia ELP3 były bardzo wyraźne, ale pomimo około 10-krotnej redukcji ilości ELP3, Doktorantka nadal obserwowała sporą aktywność migracyjną komórek. Jaki więc może być udział Elongatora w procesie ruchliwości komórek?

O ile sposób przedstawienia wyników bardzo mi się podoba: jest czytelny (poza tabelą 29: wielkość czcionki jest niezbyt duża; proszę dołączać wersję elektroniczną) i staranny, to mam pewne wątpliwości oglądając wyniki kilku WB. Otóż niezbyt zgadzają mi się masy białek z opisem w figurach (nawet biorąc pod uwagę niezbyt dużą precyzję rozdziału elektroforetycznego). I tak np. na Figurze 10 przeciwciała wykrywają KTI12 o masie 35 kDa, gdy tymczasem masa KTI12 wynosi raczej około 38 kDa. To nie jest duży zarzut, jako że ~~że!~~ nie był bardzo rozwinięty. Ale dlaczego konstrukt KTI12-Myc-FLAG ma masę aż około 48 kDa? Wydaje się, że jest to trochę za duża masa (nie umiałem znaleźć w tekście wielkości użytego konstrukt, ale patrząc się na WBs, to jest on jest zaskakująco duży). Figura ta wzbudza więcej pytań w kontekście następnej Figury (Fig. 10): skoro przeciwciała skierowane przeciw KTI12 oddziałują silnie z białkiem o masie poniżej 35 kDa, które obecne jest we frakcji jądrowej, to dlaczego na Figurze 11 (subkomórkowa lokalizacja KTI12 z wykorzystaniem tych samych przeciwciał) nie widzimy sygnału jądrowego?

Podsumowując: uważam, że rozprawa doktorska Pani Marty Smejda wnosi cenne informacje dla rozumienia zarówno funkcjonowania, jak i fizjologicznej roli białka KTI12, a

moje nieliczne wątpliwości nie umniejszają całokształtu jakości odkryć zaprezentowanych w pracy. Owe niejasności, których Doktorantka jest najwyraźniej świadoma, jako że je dyskutuje, sprawiają, że temat badawczy jest jeszcze bardziej intrygującym. Ilość różnorodnych technik z powodzeniem zastosowanych podczas pracy na temacie pokazuje, że Doktorantka jest w pełni gotowa do owocnej pracy naukowej.

Tak więc uważam, że rozprawa w pełni spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 596; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Marty Smejdy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Dariusz Rakus

