

Prof. dr hab. Jerzy Sepioł

Instytut Chemii Fizycznej PAN

w Warszawie

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Sekcja ds. pracowniczych
Wpłynęło dn. 1.7.10.2014
podpis

recenzje
przebieg
WSE

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kubackiej zatytułowanej: „Charakterystyka specyficzności miejsc wiążących ludzkich i żabich izoform eukariotycznego czynnika translacji 4E wyznaczających ich funkcję w procesie inicjacji biosyntezy białka”

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kubackiej dotyczy bardzo ważnego procesu w skomplikowanym funkcjonowaniu żywych organizmów jakim jest biosynteza białka i mechanizmy jej kontroli. Kluczowym momentem w procesie biosyntezy białka w komórce jest jej inicjacja, która polega na rozpoznaniu charakterystycznego końca mRNA tzw. kapu (w tłumaczeniu - czapeczki) przez białkowy aparat syntetyzujący, a następnie synteza zakodowanych w mRNA białek. Praca doktorska pani Kubackiej jest więc kolejną z prac związanych z tematyką „kapową” - zapoczątkowaną w Polsce - i rozwijaną z dużymi sukcesami przez prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza i jego zespół w Zakładzie Biofizyki IFD na Wydziale Fizyki UW.

Rozprawa zawarta jest na 136 stronach i składa się z sześciu rozdziałów, czterech jednostronicowych dodatków z tabelami oraz wyodrębnionego wykazu 4 publikacji, w których współuczestniczyła doktorantka.

W Rozdziale 1 „Część literaturowa” autorka zamieściła przejrzyste wprowadzenie do zagadnień związanych z badaniami własnymi. Opisała translację u organizmów eukariotycznych i rolę kapu w tym procesie oraz mechanizmy regulacji procesu inicjacji translacji. Oddzielny podrozdział został poświęcony wybranym izoformom białka eIF4E: izoformie kanonicznej eIF4E1a

(jej funkcji i strukturze) oraz izoformom regulatorowym eIF4E1b i eIF4E2. Na koniec omówione zostało białko 4E-T wiążące obie izoformy regulatorowe.

W Rozdziale 2 określającym cel badań autorka wskazuje na trzy cele pracy:

- określenie powinowactwa i specyficzności dla ludzkich i żabich (żaba szponiasta) izoform eIF4E1b względem analogów końca 5'mRNA kapu;
- weryfikację oddziaływania białka eIF4E2 z nowym partnerem białkowym 4E-T i charakterystykę specyficzności wzajemnej interakcji białek;
- zbadanie wpływu oddziaływania eIF4E2 z 4E-T na lokalizację eIF4E2 w komórkach ssaczych.

Pierwszy podrozdział Rozdziału 3 poświęcony jest specyfikacji badanych w pracy obiektów. Są to ludzkie i żabie białka eIF4E zarówno typu dzikiego (w liczbie 5 białek) jak i modyfikowane (8), a także białka 4E-T: niemodyfikowane (1) i modyfikowane (5). W podrozdziale o materiałach przedstawiono analogi kapu (w liczbie 13) użyte w badaniach. W obszernym podrozdziale o zastosowanych w pracy metodach badawczych przedstawiono wiele różnorodnych metod: od wyrafinowanych technik genetycznych stosowanych do konstrukcji wektorów plazmidowych i metod stosowanych do otrzymywania białek rekombinowanych, poprzez eksperymentalne i teoretyczne metody analizy białek - po spektroskopowe metody fluorescencji i dichroizmu kołowego stosowane w badaniach oddziaływań białko-ligand i białko-białko.

Wynikom i dyskusji poświęcony został główny, czwarty rozdział Rozprawy. O ogromie wykonanej pracy eksperymentalnej świadczy chociażby liczba około 160 stałych asocjacji między kombinacjami różnych białek i ligandów zmierzonych i zamieszczonych w tabelach Rozprawy, przy czym każda ze stałych została określona na podstawie kilku (od 3 do 10) niezależnych pomiarów w wybranych i ustalonych warunkach. Z pewnością wiele problemów pomiarowych miała Doktorantka w przypadku układów białkowych o niskiej stabilności. Znalezienie wówczas optymalnych warunków do przeprowadzenia badań jest niezwykle pracochłonne, a doświadczalny trud znany na ogół tylko eksperymentującej osobie. Ciekawym, użytym przez Doktorantkę sposobem obejścia trudności związanych z niestabilnością białka – zastosowanym w przypadku wysoce niestabilnej żabiej izoformy eIF4E1b - było wykorzystanie do

pomiarów skróconej formy białka XelF4E1b Δ N27 w roztworze buforowym w obecności 10% glicerolu, tworzącego wokół białka otoczkę solwatacyjną. Na podstawie całościowej analizy zmierzonych wartości stałych asocjacji mgr Kubacka sformułowała uogólniony wniosek, iż izoformy eIF4E1b pochodzące z żaby szponiastej i z człowieka oddziałują z analogami kapu trzykrotnie słabiej w porównaniu z kanoniczną izoformą białka eIF4E1a, zachowując jednak wyraźną specyficzność względem grupy metylowej w pozycji N⁷ dodatnio naładowanej guaniny (będącej głównym elementem strukturalnym kapu). Rzeczywiście, analiza sekwencji aminokwasów obu białek potwierdziła różnice w obrębie ich aktywnych części wiążących bezpośrednio analogi kapu. Ponadto obie izoformy indywidualnie, a także ich kompleksy z ligandami, różniły się znacznie widmami dichroizmu kołowego w bliskim i dalekim nadfiolecie. Dostępne obecnie programy obliczeniowe umożliwiają przewidywanie zmian w dichroizmie kołowym dla założonych modeli strukturalnych białek - i takie teoretyczne obliczenia zostały w pracy przeprowadzone dla ludzkiego białka eIF4E1b oraz dla kompleksu z m⁷GTP. Zaobserwowano jednak istotne różnice pomiędzy widmami różnicowymi CD [(białko+ligand)-białko] obliczonymi i zmierzonymi, których wyjaśnienie - zdaniem Doktorantki - wymaga serii dalszych badań z białkiem eIF4E1b, celowo zmodyfikowanym poprzez mutacje.

Dalsze dwa cele pracy wskazane wcześniej przez Doktorantkę dotyczą badań oddziaływania białka eIF4E2 z białkiem transportującym 4E-T oraz konsekwencji tego oddziaływania na lokalizację białka eIF4E2. Oddziaływanie eIF4E2 z 4E-T zostało zweryfikowane trzema różnymi metodami. Dodatkowo, w celach referencyjnych, zbadane było nie znane dotąd oddziaływanie białka 4E-T z kanoniczną izoformą eIF4E1a. Zróżnicowane oddziaływanie 4E-T z białkami 4E2 i 4E1a przypisane zostało motywowi niekanonicznemu typu YX₄VW i kanonicznemu YX₄LL. Badania mikroskopowe znaczonych immuno-fluorescencyjnie białek w komórkach pokazały, że chociaż oba białka 4E2 i 4E1a przenikają do jądra przez pory regulowane receptorem, to jednak białko 4E2 nie wymaga obecności białka transportującego 4E-T i pełni prawdopodobnie inną funkcję niż 4E1a - zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym.

Praca mgr Doroty Kubackiej zawiera olbrzymi materiał doświadczalny wykonany najnowszymi metodami dostępnymi w Zakładzie Biofizyki UW, a

także podczas jej zagranicznego stażu w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu w Cambridge, pod opieką dr Nancy Standart. Dojrzałość naukowa Doktorantki wyraża się między innymi kompetentną analizą uzyskanych wyników i pomysłami na rozwikłanie niektórych stwierdzonych niejednoznaczności.

Część wyników recenzowanej pracy została już przedstawiona w czasopismach z „listy filadelfijskiej” stawiających wysokie wymagania co do rzetelności przedstawianych badań. W dwóch spośród czterech opublikowanych artykułów mgr Dorota Kubacka jest pierwszym autorem.

W czasie lektury Rozprawy natrafiłem na kilkanaście literówek i nieścisłości, które sygnalizuję poniżej:

Str.7 VI Bibliografia i VI? Spis publikacji Str.23 ..w zależności od i ?proporcjonalne Str.24...lub przekrywają? się...Str.26...pracy, ?ukierunkowane...

Str.30 ...stronnie?...Str.32 ...w porównaniu?izoformą...

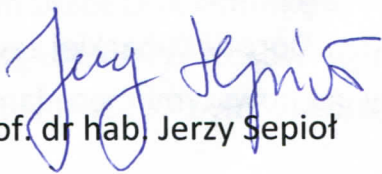
Str.46...Pracowna?...Str.51 nieoddziałującego...Str.54 nieuporządkowania..

Str.55 ..wrażonej...Str.63 ..bott..Str.73..Bark symetrii.., Str.75 w opisie rysunku 4-5 zamieniono opisy rysunków A i B, Str.76 ..eksyctonowego..., wysoka? identyczność , Str.80 ..wartość pI – nie została zdefiniowana; pI nie umieszczono w spisie skrótów; Str.85, 87 *fluorescencja* jest zjawiskiem, więc w opisie rzędnej rysunków powinna być raczej stosowana mierzona (zazwyczaj względna) *intensywność fluorescencji*, Str.89 K_{as} ?

Nieliczne zauważone niedociągnięcia nie mają wpływu na końcową ocenę. Rozprawę doktorską mgr Doroty Kubackiej oceniam jako interesującą i dobrze przygotowaną. Stwierdzam, iż:

przedstawiona rozprawa spełnia zwyczajowe a także ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Doroty Kubackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 8.10.2014 r.


Prof. dr hab. Jerzy Sepioł