



Wrocław, 8.12.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Skrzymowskiej
pt. „Ocena biochemiczna i czynnościowa efektów mutacji punktowej
Arg1098Gln łańcucha alfa II spektryny w modelach *in vitro* i *in vivo*”**

wykonanej w Laboratorium Immunologii Nowotworów

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we
Wrocławiu

Praca doktorska pani mgr inż. Joanny Skrzymowskiej pt. „Ocena biochemiczna i czynnościowa efektów mutacji punktowej Arg1098Gln łańcucha alfa II spektryny w modelach *in vitro* i *in vivo*” została wykonana w Laboratorium Immunologii Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, pod opieką naukową pana prof. dr hab. Arkadiusza Miążka w ramach grantu OPUS NCN. Rozprawa doktorska dotyczy analizy wpływu podstawienia mutacyjnego Arg1098Gln łańcucha alfa II spektryny na wybrane właściwości tego białka w układzie *in vitro*: strukturę i stabilność, agregację, oddziaływanie z białkami partnerskimi, fosforylację i stabilność proteolityczną oraz w mysim układzie *in vivo*. Niniejsza praca doktorska dotyczy ciekawego i istotnego naukowo problemu badawczego, mianowicie zidentyfikowanej wcześniej mutacji Arg1098Gln w łańcuchu alfa II spektryny, która w do tej pory nieznanym sposobie, może prowadzić do spektrynopatii.

Rozprawa doktorska przygotowana została w języku polskim w formie klasycznej pracy doktorskiej, o strukturze i składzie zgodnym z uznanym kanonem. Część z zaprezentowanych w pracy doktorskiej wyników została opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie: Scientific Reports [IF_{5-letni}=4,6; doktorantka jest trzecią autorką] oraz Biochemical Biophysical Research Communications [IF=3,1; doktorantka jest pierwszą autorką] i w 2023 roku w czasopiśmie Brain Sciences [IF=3,3; doktorantka jest trzecią autorką]. Rozprawa doktorska napisana jest technicznie poprawnie, poszczególne sekcje przedstawione zostały na odpowiednim stopniu szczegółowości i w odpowiednich proporcjach. Praca doktorska bazuje na eksperymentach z zakresu biochemii i biofizyki (m.in. izolacja białek rekombinowanych, pomiary oddziaływań międzycząsteczkowych, pomiary stabilności białek, różnorodne testy biochemiczne) oraz



testów przeprowadzanych na myszach ekspresjonujących badany wariant mutacyjny spektryny.

Część wstępna pracy doktorskiej wprowadza stopniowo do tematyki spektryny jako białka cytoszkieletu komórkowego kluczowego dla wielu komórkowych procesów. Doktorantka od ogólnej części wstępnej dotyczącej spektryny przechodzi do opisu obecnego stanu wiedzy dotyczącego budowy i funkcji poszczególnych domen spektryny, roli interakcji spektryny z wybranymi białkami partnerskimi oraz do regulacji spektryny przez proteolizę. Następnie doktorantka przedstawia spontaniczne mutacje pojawiające się w spektrynie, które prowadzą do zaburzenia stabilności powtórzeń spektrynowych oraz opisuje fizjologiczne konsekwencje takich zmian. Na końcu części wstępnej Doktorantka wprowadza mysie modele używane do badania spektrynopatii. Jednoznacznie uważam, że zarówno skład części wstępnej pracy doktorskiej, jak i jej zawartość zostały przygotowane niemal w sposób wzorowy i zostały doskonale dopasowane do dalszych części pracy, umożliwiając zrozumienie każdej jej części.

Cel pracy został jasno sprecyzowany. Część metodyczna pracy przedstawiona jest w dokładny sposób, umożliwiając ewentualne powtórzenie przeprowadzonych badań. Nie mam uwag do tych części pracy.

W następnej sekcji, „Wyniki”, Doktorantka przedstawiła szereg bardzo istotnych rezultatów swoich badań. Odnośnie tej części pracy prosiłbym Doktorantkę o odpowiedź na poniższe pytania i ustosunkowanie się do kilku uwag:

1. Rozdział „Wyniki” zaczyna się od przedstawienia rezultatów izolacji rekombinowanych wariantów spektryny niezbędnych do dalszych badań. Żel SDS-PAGE pokazuje, że uzyskano białka o wysokiej czystości (Ryc. 11). Czy, i jeśli tak, to jak, potwierdzano tożsamość uzyskanych białek rekombinowanych (spektrometria mas, western blotting, inne?).
2. Dlaczego wariant R1098Q na rycinie 11 wygląda na wysoce homogenny podczas gdy na rycinie 27, ścieżka 3 jest ewidentnie zanieczyszczony białkiem o mniejszej masie?
3. W Ryc.12 brakuje oznakowania aminokwasów na schemacie i zakresu reszt aminokwasowych użytych w badanych konstrukcjach.
4. Modelowanie strukturalne sugeruje duże zmiany w pozycji CCC pętli względem reszty białka pod wpływem mutacji R1098Q. Wydaje się jednak, że łańcuch boczny R czy Q skierowany jest w zupełnie inną stronę niż pętla CCC. Bardzo prosiłbym o opinię Doktorantki w jaki sposób na poziomie molekularnym można wytłumaczyć wpływ



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

- mutacji w pozycji 1098 na sugerowane zmiany w położeniu pęti CCC. Czy weryfikowano ten model eksperymentalnie (np. poprzez sieciowanie molekularne)?
5. Na stronie 75 wkraść się błąd edytorski, który może być istotny: „poniżej 80 nM” a nie 80 nm.
 6. Pomiar przy jakich stężeniach białka użyto do wyznaczenia parametrów kinetycznych oddziaływania badanych wariantów z kalmoduliną (s. 76, tabela 12)? Różnice w parametrach kinetycznych dla mutantów i typu dzikiego wydają się nieznaczne, podczas gdy krzywe SPR pomiarów przy niższych stężeniach wskazują na bardzo dużą różnicę pomiędzy wariantami (niemal brak oddziaływania dla mutantów). Prosiłbym o ustosunkowanie się do tych obserwacji.
 7. Czy analizowano oddziaływanie wariantów spektryny z kinazą c-Src (np. poprzez SPR)?
 8. Czy potwierdzono fosforylację wariantów spektryny (Ryc. 22) przez c-Src inną techniką (np. PhosTag, spektrometria mas, mutacje Y w miejscu rozpoznawanym przez c-Src)? Czy obserwowane wyniki to są 3 techniczne powtórzenia (Ryc. 22)? Jeśli tak, to dlaczego intensywność prążków między powtórzeniami jest bardzo różna i ostatni zestaw (ścieżki 8 i 9 u góry) są na poziomie kontroli bez ATP?
 9. Na Ryc. 23 przedstawiono proteolizę wariantów spektryny przez kalpainę poprzez obrazowanie pojawiającego się prążka o masie około 11 kDa. Czy monitorowano w czasie spadek poziomu pełnej długości użytych wariantów spektryny (czyli spadek poziomu prążków +/- 50 kDa dla białek bez GST lub +/- 75 kDa dla białek z GST)? Czy można prosić o pokazanie całych żeli/blotów, których dolny fragment widzimy na rycinie 23?
 10. Na Ryc. 25 przedstawiono analizę proteolizy wariantów spektrynowych przeprowadzoną poprzez pomiar utraty gęstości optycznej. Czy robiono próbę kontrolną dla samej kalmoduliny i kalmoduliny + kalpaina? Czy zwiększony procent utraty gęstości optycznej w próbkach z dodatkiem kalmoduliny może wynikać z efektu trawienia kalmoduliny przez kalpainę?
 11. Ryc. 26 – czy przeprowadzono analizę istotności statystycznej uzyskanych wyników?
 12. Ryc. 27 – brakuje ścieżki kontrolnej z samą kaspazą 3 (czy Doktorantka dysponuje może żelem z innego powtórzenia eksperymentu z pełnym zakresem kontrol?) Czy można przewidzieć miejsce cięcia i wynik (rozmiar proteolitycznych fragmentów)



trawienia wariantów spektrynowych kaspazą 3? Czy na żelu widzimy jakąkolwiek degradację wariantów spektrynowych, czy też pojawiający się prążek o mniejszej masie to jest dodana prokaspaza (intensywność prążków białek wyjściowych wydaje się zmieniać bardzo nieznacznie)?

13. Ryc. 28 – brak paska skali; czy Doktorantka próbowała obrazować całkowitą spektrynę w badanych preparatach? Jeśli tak, to jaki uzyskano obraz?

14. Na Ryc. 31 przedstawiono wykres z testu dot blot anty-SNTF. Czy weryfikowano testem Western Blot specyficzność sygnału anty-SNTF?

Część „Dyskusja” opisana jest w sposób merytorycznie poprawny i zawiera szereg interesujących prób interpretacji uzyskanych wyników i osadzenia ich w kontekście zastanego pola badawczego. Do tej części nie mam większych uwag.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Joanny Skrzymowskiej oceniam jako naukowo bardzo ciekawą i wartościową. Chciałbym w związku z tym serdecznie pogratulować zarówno Doktorantce jak i Promotorowi.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Skrzymowskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1668 z późn. zm.). Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Skrzymowskiej oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

dr hab. Łukasz Opaliński, prof. UWr