

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz
Kierownik Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 6 listopada 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Pauliny Rowińskiej
pt. "Identyfikacja partnerów białkowych laminy Dm i topoizomerazy II w warunkach szoku
termicznego w układzie modelowym *Drosophila melanogaster*"
wykonanej w Pracowni Białek Jądrowych Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Rzepeckiego i dr Magdaleny Machowskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia badawczego dotyczącego poznania mechanizmów udziału lamin i topoizomerazy II (białek jądrowych biorących m.in. udział w organizacji chromatyny i regulacji szeregu procesów zachodzących w jądrze komórkowym) w odpowiedzi komórek na stres termiczny. Doktorantka skupiła się na poszukiwaniach nowych partnerów tych białek w modelu badawczym *Drosophila melanogaster* oraz określeniu ich oddziaływań (również wzajemnych) w warunkach podwyższonej temperatury. Uzyskane przez nią dane dostarczyły wielu nowych informacji o interakcjach występujących w komórkach poddanych stresowi cieplnemu i umożliwiły stworzenie modelu oddziaływań dla badanych lamin i topoizomerazy.

Formalny opis rozprawy

Licząca aż 249 stron rozprawa doktorska mgr Marty Pauliny Rowińskiej została przygotowana w formie tradycyjnej i posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich. Do rozprawy dołączono płytę CD z danymi uzyskanymi podczas analiz spektrometrii mas oraz elektroniczną wersję rozprawy. Praca jest zredagowana w sposób staranny, napisana w zasadzie poprawną polszczyzną, aczkolwiek Doktorantce nie udało się uniknąć szeregu błędów stylistycznych i interpunkcyjnych czy lapsusów językowych, lecz ich liczba nie była duża zważywszy na tak obszerny materiał. Pragnę zauważyć, że Doktorantka nie ułatwiła pracy czytelnikom przedstawiając znaczną część tekstu „ciurkiem”, bez podziału na akapity, wyróżniające poruszane kwestie.

Część merytoryczna rozpoczyna się *Wykazem skrótów* (1 strona), po nim zamieszczono *Streszczenia* w języku polskim (4 strony) i angielskim (3 strony). *Wstęp* liczy 27 stron i zawiera 6 rycin/schematów). *Cele pracy* sprecyzowano na jednej stronie, a użyte *Materiały* i zastosowane *metody* opisano na 30 stronach; zamieszczono tu 13 tabeli i 1 schemat doświadczenia. Najobszerniejszą częścią jest rozdział *Wyniki* liczący aż 118 stron i zawierający 63 ryciny i 12 tabel. Kolejną część rozprawy to *Dyskusja*, przedstawiona na 26 stronach i zawierająca 1 rycinę i jedną tabelę. Po niej następuje Podsumowanie (dwie strony), Spis tabeli (jest ich w sumie 26). Kolejne części rozprawy to *Spis tabel* (jest ich łącznie 18) i *Spis rycin* (jest ich łącznie 71) oraz *Literatura*, na którą składa się 281 pozycji, w tym zdecydowana większość to prace z ostatniej dekady, co świadczy o aktualności prowadzonych przez Doktorantkę badań. Pojawiły się tu drobne potknięcia w formie cytowania, np. w poz. 189 brakuje danych bibliograficznych.

Rozprawę zamyka lista osiągnięć Autorki, w tym informacje o udziale w projektach i stażach/szkoleniach badawczych, uzyskanych wyróżnieniach i stypendiach oraz o aktywnościach

okołonaukowych. Spodziewałabym się w tym miejscu również informacji o publikacjach Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Wstęp to krótkie podsumowanie dotychczasowej wiedzy o tematyce, której poświęcona jest rozprawa. Doktorantka przedstawiła informacje o budowie jądra komórkowego, sporo miejsca poświęciła omówieniu lamin i związanych z nimi schorzeniom (laminopatiom) oraz topoizomerazie II. Poruszyła również zagadnienia związane z odpowiedzią komórkową na stres, w tym na stres termiczny, opisała też wykorzystany przez siebie model badawczy. Nie mam zasadniczych uwag do tej części rozprawy, zauważyłam jednak, że w opisie do Ryciny 4 Doktorantka odnosi się tylko do dwóch kolorów (zielonego i czerwonego) spośród sześciu prezentujących liczne mutacje w genie *LMNA*. Zabrakło mi też informacji o różnicach w sekwencji aminokwasowej pomiędzy laminą Dm i laminą C.

Punktem wyjścia rozprawy była weryfikacja hipotezy o udziale laminy i topoizomerazy II, kluczowych białek nukleoszkieletu, w epigenetycznej regulacji ekspresji genów indukowanej szokiem cieplnym. Doktorantka postanowiła zweryfikować tę hipotezę badawczą poprzez identyfikację nowych partnerów dla dwóch lamin występujących w wybranym przez siebie modelu badawczym *D. melanogaster* - laminy Dm (ortolog ssacej laminy B) i laminy C (ortolog ssacej laminy A) oraz topoizomerazy II przed i po indukcji szoku termicznego. Doktorantka jako dodatkowy cel postawiła sobie sprawdzenie zmian w rozpuszczalności badanych białek w odpowiedzi na stres termiczny. Zastanawiam się, czy przy tak obszernym materiale dotyczącym poszukiwań partnerów lamin i topoizomerazy konieczne było zamieszczanie części dotyczącej poznania właściwości fizykochemicznych tych białek. Nie rozumiem też, dlaczego Doktorantka nie umieściła w tytule laminy C, skoro znaczna część rozprawy poświęcona jest również temu białku. Doktorantka swoje zamierzenia postanowiła zrealizować w siedmiu celach szczegółowych (etapach), które następnie krok po kroku adresowała.

Dla realizacji swoich zamierzeń Doktorantka wykorzystwała dwie linie komórkowe, Kc i S2-DGRC (dalej oznaczana jako S2), wywodzące się z, odpowiednio, embrionalnych komórek żeńskich 6-12 godzin po złożeniu embrionów oraz embrionalnych komórek męskich 20-24 godziny po złożeniu embrionów. Doktorantka uzasadniła wybór tych linii specyficzną obecnością poszczególnych izoform lamin na określonych etapach rozwoju embrionalnego, acz nie jest dla mnie jasne, dlaczego - skoro to czas rozwoju embrionów, a nie płeć jest kwestią kluczową dla występowania tych białek - nie prowadzono badań na komórkach wyprowadzonych z osobników tej samej płci. Do badań Doktorantka wykorzystywała również 11-godzinne embriony *D. melanogaster*, ale w tym przypadku nie rozróżniała ich płci. W trakcie badań zastosowała wiele różnorodnych technik badawczych i analiz bioinformatycznych, opisanych aż nazbyt wyczerpująco w rozdziale *Materiały i metody*. Ten rozdział rozpoczęła od listy odczynników wykorzystanych w toku badań, podając zarówno nazwę producenta, jak i numer katalogowy (to dobry zwyczaj) oraz składu używanych roztworów i buforów, a zakończyła opisem zastosowanych przez siebie programów i narzędzi bioinformatycznych. Nie mam poważniejszych uwag do tej przejrzystej napisanej części rozprawy, ale mam wątpliwości, czy Doktorantka rozróżnia homogenat od lizatu (np. na stronie 60). Zastanawiam się, czy zastosowane przez nią warunki szoku nie powinna nazywać szokiem cieplnym, a nie termicznym, bo jak Doktorantka sama zauważa we *Wstępie* szok termiczny to znacznie szersze pojęcie. Ciekawi mnie też, co to takiego „woda odczynnikowa”, o której mowa na stronie 67.

W najobszerniejszym rozdziale, *Wyniki*, Doktorantka epicko opisuje uzyskane przez siebie dane, co powoduje, że w gąszczu czasem zbędnych informacji trudno znaleźć te najważniejsze, co nie ułatwia lektury tej części rozprawy, przedstawiającej przecież ogrom wyników i analiz. Na pochwałę zasługuje to, że zamieszczone ryciny są czytelne, w zasadzie wszystkie wyniki zostały



poddane analizie statystycznej oraz wykonano stosowne kontrole. Plusem jest również to, że Doktorantka starała się kończyć niemal każdy podrozdział przynajmniej jednozdaniowym podsumowaniem.

Badania rozpoczęto od analizy rozpuszczalności laminy Dm i topoizomerazy II, jako białka „referencyjne” wykorzystując deacetylazę histonu 1 (HDAC1), białko szoku cieplnego 70 kDa (Hsp70) oraz czynnik szoku cieplnego Hsf, o których wiadomo, że zaangażowane są w regulację transkrypcji i/lub organizację chromatyny również w warunkach szoku cieplnego. Doktorantka zaobserwowała, że w zarówno w badanych liniach komórkowych oraz w embrionach rozpuszczalność badanych białek zwiększa się w warunkach szoku cieplnego, co wskazuje na możliwe zmiany w konformacji tych białek, sugerujące ich udział w reorganizacji chromatyny wywołanej zmianą temperatury. Jak wspomniałam wcześniej – nie widzę uzasadnienia dla zamieszczenia tych danych w rozprawie.

W następnym cyklu badań Doktorantka potwierdziła metodami mikroskopowymi (immunofluorescencja i ligacja zbliżeniowa *in situ*, PLA) oraz biochemicznymi (ko-immunoprecypitacja) oddziaływania pomiędzy laminą Dm i topoizomerazą II, szczególnie w warunkach szoku cieplnego. Sporo miejsca poświęciła tu optymalizacji metody ko-immunoprecypitacji. Nie wiem, czy to było zasadne, bo rozprawa nie była przecież poświęcona kwestiom metodycznym. Doktorantka zaobserwowała również dla komórek Kc obecność na membranie podwójnego prążka odpowiadające laminie Dm, co jej zdaniem może świadczyć o zmianie w profilu fosforylacji. Zastanawiam się, dlaczego te różnice występują tylko w jednej linii komórkowej. Ponadto, czy Doktorantka (lub koledzy z pracowni) mają w planach sprawdzenie, czy oba białka mogą ze sobą oddziaływać bezpośrednio, gdyż przedstawione w rozprawie wyniki nie wykluczają wprawdzie takiej możliwości, ale nie upoważniają do takiego wniosku.

Główna część rozdziału *Wyniki* to dane i analizy dotyczące identyfikacji partnerów badanych białek w warunkach szoku cieplnego, uzyskane z wykorzystaniem techniki spektroskopii mas we współpracy ze Środowiskową Pracownią Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Doktorantka stwierdziła, że liczba potencjalnych partnerów dla badanych białek zmienia się po indukcji szoku cieplnego, acz znaczna część z tych białek pozostaje wspólna dla obu warunków badawczych. Podobne obserwacje poczyniono dla obu typów komórek, choć występują pewne różnice w liczbie zidentyfikowanych białek. Badania te potwierdziły również oddziaływania pomiędzy obiema laminami oraz laminami i topoizomerazą II. Zastanawia mnie duża różnica (sięgająca w niektórych przypadkach 10-krotności) w liczbie zidentyfikowanych białek w kolejnych powtórzeniach biologicznych. Z czego to może wynikać?

Wśród zidentyfikowanych potencjalnych partnerów dla laminy Dm były składowe kompleksu poru jądrowego, otoczki jądrowej, białka zaangażowane w odpowiedź na stres termiczny, a wśród tej ostatniej grupy były białka zaangażowane m.in. w organizację chromosomów politenicznych, metabolizm RNA, translację i odpowiedź na uszkodzenia DNA. Doktorantka stwierdziła też, że wśród zidentyfikowanych białek po indukcji szoku cieplnego poziom szeregu białek się zwiększał (te zaangażowane w potranslacyjnej regulacji ekspresji genów, splicingu RNA, wiązaniu RNA oraz metabolizmie RNA, a także białka zaangażowane w odpowiedzi komórek na stres), a szeregu zmniejszał – np. białek zaangażowanych w wiązanie ATP i DNA oraz organizację chromatyny. Udało się jej również wykazać oddziaływanie laminy Dm z markerami granuli stresu, co było nowym odkryciem, specyficznym jedynie dla tej izoformy białka.

Wśród potencjalnych partnerów laminy C znalazły się białka zaangażowane w fałdowanie białek i translację, związane z systemem błon wewnętrznych (ER i rybosomy, aparat Golgiego i otoczka jądrowa). Doktorantka nie zaobserwowała jednak znaczących różnic po indukcji szoku cieplnego;

podobne obserwacje co do braku różnic poczyniła również dla topoiomerazy II. Ciekawa jestem opinii Doktorantki, co do przyczyny tej obserwacji.

Poszukiwanie partnerów dla topoiomerazy wykazało oddziaływania z białkami zaangażowanymi w wiązanie nukleotydów, procesy fałdowania białek oraz odpowiedzi komórkowej na stres; wśród nich były m.in. białka zaangażowane w translację i biogenezę rybosomów, organizację chromatyny i eksport z jądra do cytoplazmy.

Doktorantka dla każdego z badanych białek i typu komórek opracowała - na podstawie uzyskanych wyników - sieci powiązań/kompleksów, w które te białka są zaangażowane. Analizy te potwierdziły w obu typach komórek oddziaływania laminy Dm i topoiomerazy z kompleksami białek, które są zaangażowane w transport mRNA, splicing, regulację transkrypcji i biogenezę rybosomów. Wykazały również różnice w interaktomach w zależności temperatury, szczególnie pomiędzy laminą Dm i laminą C.

Dyskusja jest długa (bo i wiele było kwestii do przedyskutowania), podzielona na części odnoszące się do poszczególnych partii wyników. Mam wrażenie, że zbyt dużo tu powtórzeń z wyników i zbędnych informacji, momentami jest ona "przegadana", co utrudnia lekturę. Nie rozumiem też potrzeby zamieszczenia w tej części rozprawy ryciny odnoszącej się do aspektów metodycznych. Wydaje mi się, że te kwestie mogą wynikać z faktu, że wyniki przedstawione w rozprawie nie zostały jeszcze opublikowane i to podczas pisania rozprawy Doktorantka po raz pierwszy dokonywała analizy i selekcji olbrzymiego materiału. Mam nadzieję, że dzięki temu łatwiej będzie jej przystąpić do opracowania wyników i analiz na potrzeby manuskryptu/manuskryptów.

W części *Podsumowanie* Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki z rozbiciem na poszczególne białka, to dobry zabieg zważywszy na ogrom materiału.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Rowińskiej ma dużą wartość poznawczą; Doktorantka dostarczając wielu nowych danych znacznie poszerzyła wiedzę o laminach i topoiomerazie II oraz o ich oddziaływaniach zarówno wzajemnych, jak i z innymi kompleksami z komórkach w warunkach stresu cieplnego. Lektura rozprawy pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka wykazała się umiejętnością zdefiniowania i rozwiązania ważnego problemu badawczego oraz zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane przez nią wyniki są nowatorskie i stanowią - co jak sama wskazuje - podstawę do dalszych badań, zaś wyciągnięte w rozprawie wnioski są uzasadnione. Przedstawione w recenzji uwagi i krytyczne komentarze nie umniejszają mojej pozytywnej oceny tej rozprawy, aczkolwiek mam nadzieję, że podczas obrony Doktorantka odniesie się do tejsze krytyki.

Rozprawa doktorska mgr Marty Pauliny Rowińskiej spełnia warunki i kryteria stawiane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o nauce i szkolnictwie wyższym o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie mgr M.P. Rowińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Maria Jolanta Rędownicz