Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki
Zakład Biofizyki Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

Kraków, 15 września 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej przedstawionej przez Panią mgr Marlenę Cichocką, zatytułowanej
Nowe funkcje białka hnRNP UL1 w komórkach ludzkich

Badania naukowe opisane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Marleny Cichockiej zostały wykonane w Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, na Wydziale Biologii, w Zakładzie Ekspresji Genów, w Laboratorium Dojrzewania RNA, pod opieką pani prof. dr hab. Katarzyny Raczyńskiej.

Uwagi ogólne

Rozprawa ma klasyczny układ rozdziałów, liczy 112 stron. **Zwraca uwagę jasność opisu tła problemu, wykorzystanych metod i dokonanych obserwacji.**

Wstęp rozprawy zwięźle opisuje białko hnRNP UL1, którego rola w komórce jest przedmiotem badań. Autorka opisała również budowę, funkcje i zmiany organizacji jąderka, mechanizmy naprawy DNA jądrowego i jąderkowego, oraz interakcje między białkami hnRNP UL1, FUS i cząsteczkami U7 snRNA. Rozdział ten dobrze wprowadza w problematykę, którą interesuje się Doktorantka i jasno przedstawia tło badanych problemów. Tekst opisuje wykonane badania w kontekście innych badań prowadzonych w Laboratorium Dojrzewania RNA, oraz przedstawia je na tle istniejącej wiedzy naukowej.

Cel badań przeprowadzonych przez Doktorantkę jest przedstawiony zwięźle i jasno. Jednak rozdział *Cel pracy* zawiera zarówno sformułowanie celów badań, jak i hipotezy oraz stwierdzenie o wykonanych badaniach sformułowane w czasie przeszłym.

Materiały i Metody są obszernym rozdziałem zawierającym wszelkie niezbędne, szczegółowe informacje o wykorzystanych metodach badawczych. **Rozdział ten jest ilustracją bardzo szerokiego wachlarza zaawansowanych i uzupełniających się technik badawczych, które Doktorantka stosowała w swoich badaniach.**

Rozdział Wyniki to zwięzły opis rezultatów badań wykonanych przez Doktorantkę samodzielnie lub, w kilku przypadkach, we współpracy z innymi badaczami naukowymi.

Dyskusja jest również zwięzła, ciekawa i dobrze analizuje wyniki badań Doktorantki w zestawieniu z postawionymi hipotezami oraz opublikowanymi wynikami badań innych badaczy.

Cytowana literatura zawiera najnowsze pozycje, jak i prace opublikowane wcześniej, ale bez klasyków n/t struktury i licznych funkcji jąderka z okresu badań z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i świetlnej.

Należy zauważyć, że Autorka rozprawy wyraźnie zaznacza, gdy wspomniane w tekście wyniki badań były wynikiem współpracy lub otrzymała inna osoba. Zasługuje to na podkreślenie i pochwałę, zważywszy, że niekiedy autorzy wielowątkowych prac doktorskich, które są oparte na wykorzystaniu licznych metod badawczych i współpracy naukowej, zapominają o opisaniu wkładu innych osób, które brały udział w badaniach.

Wartość naukowa przeprowadzonych badań

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę stanowią istotny przyczynek do wiedzy o funkcjach białka hnRNP UL1 w komórkach ludzkich (HeLa i HEK) hodowanych w warunkach *in vitro*.

Doktorantka wykazała, że białko hnRNP UL1 jest obecne w jąderkach komórek HeLa i pełni rolę w rekrutacji polimerazy RNA Pol I do promotorów genów kodujących rRNA. hnRNP UL1 może stymulować transkrypcję genów rRNA, a usunięcie genu kodującego białko hnRNP UL1 prowadzi do zmian w ekspresji genów kodujących rRNA. Wśród postulowanych ról białka jest również transport białek rybosomowych.

Druga grupa bardzo interesujących obserwacji opisanych przez Doktorantkę dotyczy roli białka hnRNP UL1 w procesach odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA (DDR). Pani mgr Marlena Cichocka wykazała, że usunięcie genu kodującego białko hnRNP UL1 powoduje zwiększenie wrażliwości komórek HEK na uszkodzenia DNA. Co więcej, badane białko może oddziaływać w jąderkach z kluczowymi białkami zaangażowanymi w DDR, jak histon γH2AX oraz białka RPA32, XRCC1 i Chck1. Sugeruje to, iż białko hnRNP UL1 jest zaangażowane zarówno w naprawę jedno- jak i dwuniciowych pęknięć rDNA.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania interakcji między białkami hnRNP UL1, FUS i cząsteczkami U7 snRNA wykazały, że FUS i hnRNP UL1 oddziałują ze sobą najsilniej poza fazą S cyklu podziałowego komórki, a po wyciszeniu hnRNP UL1 poziom FUS maleje, podczas gdy poziom U7 snRNA pozostaje bez zmian. Wyciszenie FUS powoduje natomiast wzrost poziomu hnRNP UL1. Przeprowadzone badania wskazują zatem na możliwą konkurencję między FUS i hnRNP UL1 podczas wiązania z U7 snRNA. Ponadto Doktorantka wykazała, że poziomy ufosforylowanej i defosforylowanej formy białka hnRNP UL1 zmieniają się w czasie cyklu podziałowego komórki oraz, że białko hnRNP UL1 nie hamuje ekspresji genów histonowych w fazie G1 i G2, ale może hamować ją w fazie S.

Na podstawie informacji zawartych w rozprawie i danych literaturowych można przypuszczać, że hnRNP UL1 to białko wielofunkcyjne, a zdobyte przez Doktorantkę informacje można porównać do elementów dużej łamigłówki, z której, po dodaniu kolejnych fragmentów, wyłania się powoli obraz zaangażowania białka hnRNP UL1 w kluczowe procesy komórkowe – biogenezę rRNA, kontrolę syntezy histonów i mechanizmy naprawy jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. Obserwacje opisane w rozprawie doktorskiej pani mgr Marleny Cichockiej stanowią zatem cenny przyczynek do wiedzy o tych procesach.

Komentarze i pytania

Zapoznanie się z wynikami badań opisanych w pracy doktorskiej pani mgr Marleny Cichockiej nie nasunęło mi żadnych istotnych uwag krytycznych.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi jednak następujące drobne uwagi i pytania:

1. Nokodazol i nadmiar tymidyny użyto do synchronizacji komórek, jednak należy rozważyć możliwość, iż czynniki te mogą również wywoływać uszkodzenia DNA (Chiu, Wei-Hsin, et al. Biochemical pharmacology 83.9 (2012): 1159-1171; Halicka et al. Methods Mol Biol. 2017;1524:107-119; Darzynkiewicz et al. Methods Mol Biol. 2011;761:85-96; Kurose et al. Cell Prolif. 2006 Jun;39(3):231-40). Czy świadomość, że mogło dojść do indukcji takich uszkodzeń może wpłynąć na interpretację uzyskanych wyników?
2. Doktorantka wykonała eksperymenty, których celem było zidentyfikowanie ścieżki naprawy DNA, w której bierze udział badane białko hnRNP UL1, jednak doświadczenia te nie dały jednoznacznej odpowiedzi, a wyniki doświadczeń z wykorzystaniem metody immunoprecypitacji (Rys. 14) nie zostały potwierdzone w badaniach z wykorzystaniem immunofluorescencji. Czy udoskonalenie procedury immunofluorescencji i optymalizacja rejestracji obrazów mikroskopowych mogą pozwolić na uzyskanie poszukiwanej odpowiedzi?
3. W rozdziale Wyniki znajduje się stwierdzenie, że hnRNP UL1 kolokalizuje w jąderkach z nukleoliną (Rys. 3A). Na obrazach mikroskopowych nie widać takiej kolokalizacji. Podobnie twierdzenie, że hnNP UL1 częściowo kolokalizuje z FUS i U7 snRNA nie znajduje odzwierciedlenia w Rys. 3BC.
   Jakość wydrukowanych obrazów jest z konieczności znacznie gorsza niż obrazów oryginalnych oglądanych na dobrym monitorze. Może zatem warto wybrane obrazy zaprezentować na obronie pracy doktorskiej?
4. Badanie poziomu γH2AX (Rys. 11) powinno polegać na pokazaniu i policzeniu ognisk γH2AX w jądrach komórek porównywanych grup. Obrazy na Rys. 11 nie pozwalają na dokonanie takiego porównania. Ponadto obrazy na Rys. 11 pokazują DNA wybarwione DAPI w komórkach HEK UL1 KO, ale fluorescencja DAPI w komórkach HEK WT jest prawie niewidoczna. Na obrazach brak odcinków skalujących, zatem trudno interpretować wyniki ujęte na Rys. 11. Rysunek 12 jest również trudny w interpretacji ze względu na niską rozdzielczość i mały kontrast obrazów.
5. Rys. 13 pokazuje *przeżywalność* komórek po traktowaniu inhibitorami topoizomeraz, jednak termin *przeżywalność* nie wydaje się opisywać w pełni tego eksperymentu. Przeżywalność zazwyczaj definiuje się jako zależność liczby żywych komórek od stężenia czynnika cytotoksycznego lub dawki promieniowania jonizującego, a w tym przypadku pokazano zmiany liczby żywych komórek w czasie. Krzywa ta wydaje się zawierać przejściowy wzrost tej liczby (czy wynikający z podziałów komórek przeżywających?) po ok 25 godzinach od traktowania w/w inhibitorami.
6. Podobnie Rys. 15A pokazuje XRCC1 (immunofluorescencja) i zmianę sygnału po traktowaniu etopozydem lub kamptotecyną, jednak w kontroli sygnał jest bardzo słaby, podczas gdy po traktowaniu inhibitorami topoizomeraz sygnał XRCC1 jest bardzo silny. Na obrazach ogniska XRCC1 są słabo widoczne ze względu na małe powiększenie (podobna uwaga dotyczy białka 53BP1, panel B). Powstaje pytanie czy białka XRCC1 jest więcej po traktowaniu ETP lub CPT, czy całkowita ilość białka jest taka sama, ale białko skupione jest w ogniskach naprawy DNA (lub ciałkach stresowych). Podstawowa analiza ilościowa byłaby tu bardzo pomocna.
7. Doktorantka wymienia składniki białkowe jąderka i ich role, w tym translację. Uważa się, iż synteza białek nie zachodzi w jądrach (choć warto wspomnieć pracę Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. Science. 2001 Aug 10;293(5532)), zatem jaka może być rola tych białek w jąderku?

<u>Opracowanie redakcyjne rozprawy</u>

Rozprawa posiada pewne niedociągnięcia redakcyjne:

Numeracja stron w spisie treści nie zgadza się tekstem (np. Cel pracy jest na str. 23, a nie 22, Wyniki na 67 a nie 65, itd.)

Numeracja rysunków jest podana błędnie – np. rysunek 6 wspomniany na str. 49 w rozprawie ma numer 5 (znajduje się na stronie 71).

Odnośniki do prac Mato-Perdemo, Mosser i kilku innych (str. 111) są niepełne.

Rys. 3ABC – nie podano rozmiarów odcinka skalującego. Bark również informacji o skali na Rys. 4D. Czy powiększenie w górnym i dolnym rzędzie jest takie samo?

Precyzja użytej terminologii i język rozprawy

Niektóre sformułowania użyte w pracy nie są precyzyjne, lub można je zaliczyć do grupy makaronizmów, co powoduje, iż tekst robi wrażenie, iż nie został starannie opracowany. Oto przykłady:

„Jąderko komórkowe jest zorganizowane wokół wielu kopii genów rybosomowego RNA (rRNA), które tworzą heterochromatynę okołojąderkową PH (ang. peri-nucleolar heterochromatin), w fibrylarnych częściach jąderka (Fig. 1)…” – stwierdzenie to wydaje się sugerować, że heterochromatyna okołojąderkowa jest zlokalizowana w centrum fibrylarnym jąderka. Ponadto Rys. 1 pokazuje schemat, który odnosi się do obrazu mikroskopowego, na którym jednak nie widać trzech wyróżnionych składników jąderka (FC, DFC, GC).

„…mikrohomologiczne łączenie zasad MMEJ, (ang. microhomology-mediated end joining)” (str. 14) nie wydaje się poprawnym terminem polskim, ani nie jest poprawnym tłumaczeniem z angielskiego.

„Paraformaldehyd użyty do utrwalania komórek” (str. 64). Paraformaldehyd to polimer, które nie może służyć do utrwalania komórek (przez wytwarzanie wiązań krzyżowych białko-białko). Do utrwalania użyto z pewnością formaldehydu.

W nazwie “dulbecco modified eagle’s medium” (str. 24) powinno się pisać Dulbecco i Eagle dużymi literami – wszak to są nazwiska ludzi (Renato Dulbecco i Harry Eagle).

„…podwójnych uszkodzeń DNA…” (str. 83) - powinno brzmieć „dwuniciowych pęknięć cząsteczek DNA”

„Figury” w odniesieniu do rysunków i rycin

Pożywka „suplementowana” o odniesieniu do pożywki uzupełnionej surowicą do stężenia…

„inhibicja” – można też powiedzieć „hamowanie” (aktywności enzymu, genu)

„DNA ze spermy łososia (str. 28)” – DNA pochodziło z plemników łososia

„Poziom cząstki” (str. 22)

„Eukariotów” (zamiast eukariontów)

„Szlaki komórkowe jak: śmierć komórki” (s 12)

„Regulują syntezą (str. 12) (..aktywnością, str. 15) – regulują syntezę lub kierują syntezą

„… przecinany tuż za zakonserwowaną strukturą pętlą…”

„Ilość komórek” (str.41) – komórki to rzeczownik policzalny – wszak Doktorantka je liczyła

„Reakcję inkubowano w 37°C” (str. 44)

„Plazmidy wyizolowano kitem” (str. 43)

Ogólna ocena:

W badaniach opisanych w rozprawie Doktorantka użyła wielu metod badawczych i wykonała z powodzeniem szereg doświadczeń, które istotnie wzbogacają wiedzę o rolach pełnionych przez białko hnRNP UL1 w komórkach ludzkich. Wyniki badań pani mgr Marleny Cichockiej prowokują do zadania dalszych, szczegółowych pytań o role pełnione przez hnRNP UL1 w transkrypcji genów kodujących rRNA, kontroli syntezy histonów oraz naprawie pęknięć nici DNA. Niewielkie potknięcia językowe i redakcyjne, które wspomniałem powyżej, nie umniejszają wartości przeprowadzonych badań.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Marleny Cichockiej spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie pan mgr Marleny Cichockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

15 września 2023

....

data sporządzenia recenzji podpis recenzenta