

Toruń, dnia 24.06.2013 r.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana magistra Konrada Szczepana Winnickiego
pt. „Aktywacja mechanizmów kontrolnych cyklu komórkowego oraz zmiany dynamiki
transkrypcji indukowane hydroksymocznikiem w merystemach korzeni *Vicia faba*”**

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego w Katedrze Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego, promotorem pomocniczym jest dr hab. Justyna Teresa Polit. Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta na podstawie decyzji Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 23.04.2013 r. Rozprawa została przedstawiona w formie spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów doświadczalnych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych z tak zwanej Listy Filadelfijskiej i jednego artykułu przeglądowego w polskim czasopiśmie. W dwu artykułach Pan mgr Konrad Szczepan Winnicki jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a w dwu pozostałych jedynym autorem. Taka forma rozprawy jest zgodna z obowiązującymi obecnie przepisami Prawa o Szkolnictwie Wyższym. Ponadto zbiór prac zawiera również streszczenia w języku polskim i w języku angielskim oraz oświadczenia dwóch współautorów tych prac – promotora i promotora pomocniczego. Oświadczenia w sposób jednoznaczny umożliwiają określenie wkładu Doktoranta w ich powstanie.

Wymienione prace doświadczalne opublikowano w latach 2012-2013, w następujących anglojęzycznych czasopismach: *Plant Physiology and Biochemistry* (jedna praca z 2012 r.) *Protoplasma* (2 prace z 2013 r.) o współczynniku *Impact Factor* odpowiednio: 2,775, 2,855, 2,855. Praca przeglądowa na temat kodu epigenetycznego ukazała się w *Postęпах Higieny i*

Medycyny Doświadczalnej w 2009 r. Trzy prace są z wolnym dostępem (typu Open Access) co powinno pozytywnie wpłynąć na indeks cytowań tych wartościowych prac.

Badania, których opublikowane wyniki stanowią pracę doktorską, prowadzone były na korzeniach rośliny modelowej *Vicia faba*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały trafność takiego wyboru. Na podkreślenie zasługuje bogata metodyka badań. Od technik detekcji transkrypcji (metoda Click-iT RNA), poprzez metody immunocytochemiczne włącznie ze sprawdzaniem swoistości używanych przeciwciał metodą Western blot; metody biochemiczne, pomiary ilościowe z mikroskopową detekcją fluorescencji oraz cytometria przepływowa, która pozwoliła na otrzymanie wiarygodnych statystycznie wyników pomiarów.

Odpowiednio dobrany model i kompleksowe badania pozwoliły na uzyskanie wielu nowatorskich wyników dotyczących przebiegu cyklu komórkowego oraz mechanizmów jego regulacji. W streszczeniu napisanym precyzyjnym językiem możemy prześledzić kolejne kroki, zadawane pytania i uzyskiwane na nie odpowiedzi, które prowadziły tego młodego badacza do zrozumienia procesów związanych z regulacją cyklu komórkowego u roślin. Do najważniejszych wyników należy zaliczyć:

- Wykazanie, że uszkodzenia DNA indukowane przez hydroksymocznik (HU) wpływają na wzrost aktywności transkrypcyjnej mierzonej metodą *in situ* detekcji transkrypcji z użyciem 5-etynylourydyny (Protoplasma 250: 251-259, 2013). Badania te wykazały, że wzrost transkrypcji wywołany przez HU obserwowano nie tylko w fazie S, ale także w fazie G1 i G2. Wskazuje to, że odpowiedź komórek jest procesem złożonym, prowadzącym nie tylko do ekspresji genów odpowiedzialnych za naprawę DNA i regulację cyklu komórkowego, ale także za ogólne zmiany metabolizmu komórkowego.
- Wykazanie, że zmianom poziomu transkrypcji indukowanym przez hydroksymocznik towarzyszy wzrost acetylacji histonu H4 w pozycji Lys5 i zwiększenie puli kompleksu polimerazy RNA II (Protoplasma 250: 251-259, 2013).
- Potwierdzenie, że kinazy sensoryczne ATM/ATR biorą udział w regulacji transkrypcji, w odpowiedzi na stres genotoksyczny. Po zastosowaniu kofeiny inhibitora tych kinaz obserwowano wzrost acetylacji cząsteczek histonu H4 (Protoplasma 250: 251-259, 2013).

- Zbadanie czy roślinny homolog kinazy p38, odpowiedzialnej u zwierząt za aktywację genów indukowanych stresem, odgrywa podobną rolę u roślin w regulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Okazało się, że inhibitor kinazy p38 nie znosi funkcji punktów kontrolnych, zwiększa natomiast stopień dezintegracji materiału genetycznego podczas przedwczesnej kondensacji chromosomów indukowanej przez kofeinę. Przejawia się to wzrostem liczby aberracyjnych mitoz oraz komórek interfazowych z mikrojądrami (Plant Physiol. Biochem. 60: 129-136, 2012).
- Ustalenie, czy fosforylacja tyrozyny 15 w kinazach Cdk, będąca kluczowym mechanizmem blokującym jej aktywność w odpowiedzi na uszkodzenia DNA u zwierząt, odgrywa podobną rolę w regulacji cyklu komórkowego u roślin (Protoplasma DOI 10.1007/s00709-013-0490-2, 2013). Wykazano ATM/ATR zależny mechanizm tej potranslacyjnej modyfikacji kinaz Cdk i znaczącej roli tej modyfikacji w tych procesach regulacji cyklu komórkowego, które stanowią odpowiedź na uszkodzenia DNA, ale dotyczy to głównie okresu G1 i fazy S.

Uwagi:

Pan magister Konrad Winnicki wybrał dość trudną metodę analizy systemu aktywacji mechanizmów kontroli cyklu przez użycie czynnika stresującego, jakim jest hydroksymocznik. Jest to jednak związek, który ma szerokie spektrum działania. Przez inhibicję reduktazy rybonukleotydowej zmniejsza on pulę dostępnych deoksyrybonukleotydów. Odgrywa przez to fundamentalną rolę w ilości dostępnych nukleotydów wymaganych podczas replikacji i procesów naprawy DNA. W jego obecności są jednak generowane także reaktywne formy tlenu uszkadzające strukturę DNA również w pozostałych fazach interfazy. Mamy tu wtedy do czynienia z różnymi mechanizmami prowadzącymi do uszkodzeń DNA. Z badań prowadzonych na innych modelach wiadomo, że pod wpływem HU aktywowanych jest szereg genów - w tym metabolizmu podstawowego, które nie zawsze muszą być związane bezpośrednio z procesem zatrzymania cyklu w punktach kontrolnych i z naprawą DNA. Również badania prezentowane w niniejszej rozprawie to potwierdzają, gdyż rośnie poziom całkowitej transkrypcji, następują związane z tym modyfikacje epigenetyczne, rośnie poziom polimerazy RNA II, a nawet aktywność jąderek, co musi być związane z podniesieniem poziomu translacji syntetyzowanych w tym okresie białek. Mało natomiast wiadomo na temat molekularnych podstaw tych procesów. Ale

tak jest w przypadku stosowania inhibitorów różnych procesów komórkowych, które działają wielokierunkowo i modyfikują więcej niż jeden proces czy czynnik. W badaniach nad cyklem komórkowym powszechnie stosuje się choćby takie fizyczne czynniki stresu genotoksycznego jak promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, które także prawdopodobnie wpływają na wiele procesów komórkowych. Jednakże wyniki tych badań wniosły wiele informacji o komórkowej odpowiedzi stresowej. Pomimo tego, iż HU może wpływać na wiele procesów komórkowych jest jednak szeroko stosowany w tego typu badaniach zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych. Podczas obrony z ciekawością wysłuchałbym opinii doktoranta na temat wad i zalet czynników stresowych powszechnie używanych w badaniach kontroli cyklu komórkowego, w tym hydroksymocznika, czy innych czynników zarówno chemicznych jak i fizycznych.

Badania przedstawione w tej rozprawie wpisują się również w najlepszy nurt badań fizjologii komórki. Należy podziwiać rzetelność tych badań i logikę prowadzonych kolejnych eksperymentów, szczególnie, że ilość informacji dotycząca systemu kontroli cyklu jest zdecydowanie uboższa u roślin niż u zwierząt. Procesy te są konserwowane ewolucyjnie, co pozwala na poszukiwanie analogii między królestwami, z czego umiejętnie skorzystał doktorant. Doświadczenia elegancko przeprowadzone przez autora dysertacji udowodniły nadrzędną rolę kinaz sensorycznych w regulacji cyklu komórkowego u roślin. Zastosowanie HU, a następnie inhibitorów kinaz dało bardzo spektakularne wyniki. Wykazano także, że kinazy aktywowane mitogenami (MAP kinazy) w merystemach korzeni *Vicia faba* biorą udział w szlaku sygnałowania w odpowiedzi na stres genotoksyczny pod wpływem HU, choć - w przeciwieństwie do sytuacji w komórkach zwierzęcych - nie wpływają bezpośrednio na regulację punktów kontrolnych cyklu. Jednak prawdopodobnie współdziałają z kinazami sensorycznymi podczas odpowiedzi na taki stres, na co wskazują niniejsze badania. Dalsze eksperymenty wykazały, że inhibicyjna fosforylacja Tyr15 dla kinaz cyklino zależnych odgrywa znaczącą rolę podczas zatrzymania cyklu komórkowego w odpowiedzi na stres wywołany HU. Wykazano, że podobnie jak u zwierząt, ta fosforylacja jest zależna od kinaz sensorycznych ATM/ATR. Ciekawe, że przy podobieństwach w funkcjonowaniu tego systemu u roślin i zwierząt podczas faz G1/S udało się autorowi wykazać różnice podczas fazy G2/M. Może to wynikać z braku znanych u roślin odpowiedników homologów kinaz Chk1 i Chk2 podległych kinazom sensorycznym pośredniczącym w kaskadzie szlaku sygnałowego prowadzącego do inhibicyjnej fosforylacji Tyr15 dla kinaz cyklino zależnych. Na koniec warto jeszcze podkreślić wyniki związane ze sprawdzeniem czy za obniżenie

poziomu tych kinaz z fosforylacją Tyr15, po wycofaniu się z bloku wywołanego HU, odpowiada degradacja typu proteosomalnego. Wyniki wskazują, że jest za to odpowiedzialny inny nieznan mechanizm.

Do rozprawy doktorskiej została również włączona praca przeglądowa napisana samodzielnie przez Doktoranta. W pracy tej skupił się na epigenetycznych modyfikacjach chromatyny, związanych głównie z modyfikacjami cytozyny w DNA i metylacją oraz acetylacją histonów. Opisał również rolę modyfikacji histonów, w regulacji ekspresji genetycznej, a także rolę kodu epigenetycznego w wyznaczeniu miejsc inicjacji oraz czasu replikacji DNA.

Ponieważ wszystkie publikacje eksperymentalne ukazały się w uznanych międzynarodowych czasopismach naukowych, charakteryzujących się bardzo staranną redakcją przyjmowanych prac, nie będę tutaj omawiał ich strony edytorskiej. Jest ona bardzo dobra.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Konrada Szczepana Winnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą wnoszącą do istniejącej wiedzy ważne fakty o regulacji cyklu komórkowego u roślin, pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Dariusz Jan Smoliński