



Poznań, dnia 3 czerwca 2013 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Konrada Szczepana Winnickiego
**pt.: "Aktywacja mechanizmów kontrolnych cyklu komórkowego oraz
zmiany dynamiki transkrypcji indukowane hydroksymocznikiem
w merystemach korzeni *Vicia faba*".**

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy mechanizmów kontrolujących prawidłowy przebieg cyklu komórkowego, które stanowią fundamentalne procesy dla każdej komórki, a ogrywiają szczególnie ważną rolę w warunkach, w których dochodzi do uszkodzeń materiału genetycznego. W regulacji tych procesów uczestniczy wiele różnorodnych cząsteczek regulatorowych, których funkcja jest intensywnie badana w komórkach ludzkich, zwierzęcych oraz drożdżowych. W ciągu minionych kilkunastu lat opisano również szereg białek oraz kodujących je genów uczestniczących w kontroli cyklu komórkowego roślin. Obecnie wiemy już, że chociaż kluczowe regulatory cyklu komórkowego (cykliny i kinazy cyklinozależne - CDK) są podobne u wszystkich organizmów eukariotycznych, jednak niektóre białka uczestniczące w tych procesach, w tym w kontroli integralności genomu są inne lub funkcjonują w odmienny sposób niż u pozostałych organizmów eukariotycznych (np. kinazy Chk1 i Chk2, fosfatazy cdc25 lub miejsca i funkcje specyficznych fosforylacji).

Pan mgr Konrad Sz. Winnicki wykonał swoją pracę doktorską w Katedrze Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego, który od wielu lat stawia przed swoimi młodszymi współpracownikami trudne i nowe zadania związane



z funkcjonowaniem cyklu komórkowego. Promotorem pomocniczym rozprawy jest Pani dr hab. Justyna Teresa Polit.

Cele badań niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczyły:

- wyjaśnienia czy uszkodzenia DNA indukowane hydroksymocznikiem wpływają na aktywność transkrypcyjną komórek merystematycznych *Vicia faba* i czy w procesach tych uczestniczą kinazy sensoryczne ATM/ATR, które w komórkach zwierząt aktywują białko p38 (należące do szlaku kinaz MAPK) i którego funkcja w komórkach roślin jest dotychczas tylko hipotetyczna
- ustalenie szlaku metabolicznego odpowiedzialnego za regulację aktywności transkrypcyjnej w warunkach stresu genotoksycznego
- wykazania, czy fosforylacja tyrozyny 15 w kinazach cyklinozależnych, odpowiedzialna za blokowanie ich aktywności w odpowiedzi na uszkodzenia DNA u zwierząt, odgrywa podobną rolę w regulacji cyklu komórkowego roślin.

Sformułowanie powyższych celów w ramach realizacji rozprawy doktorskiej, uważam za ważne i ambitne zadania, w pełni uzasadnione merytorycznie.

Mgr Konrad Sz. Winnicki wywiązał się z realizacji założonych celów pracy w sposób wyróżniający. W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zawarł trzy pierwszoautorskie oryginalne prace twórcze opublikowane w latach 2012 i 2013 w renomowanych czasopismach: *Protoplasma* i *Plant Physiology and Biochemistry* oraz pracę przeglądową opublikowaną w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej*.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt.: "Increased transcription in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Vicia faba*" opublikowanej w czasopiśmie *Protoplasma* mgr Konrad Sz. Winnicki wykazał, że stres genotoksyczny wywołany działaniem hydroksymocznika powoduje intensyfikację transkrypcji we wszystkich fazach cyklu komórkowego i dotyczy zarówno jąder jak i obszarów nukleoplazmy pozająderekowej. Wynik ten wskazuje, że wzrost transkrypcji jest nie tylko związany z aktywacją genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, ale również sugeruje inne, szersze



zmiany w metabolizmie komórki. Autor, wraz ze współpracownikami, wykazał, że indukowanemu hydroksymocznikiem wzrostowi transkrypcji towarzyszy zwiększenie poziomu dużej podjednostki polimerazy RNA II w jądrze komórkowym oraz acetylacja lizyny 5 w histonie 4, co z kolei wskazuje na związek między aktywacją transkrypcji a modyfikacją histonów. Uzyskane wyniki opisują więc nowy, dotychczas prawie nieznan, mechanizm działania hydroksymocznika w komórkach eukariotycznych.

Druga praca mgr Winnickiego pt: „SB202190 affects cell response to hydroxyurea-induced genotoxic stress in root meristems of *Vicia faba*” ukazała się w czasopiśmie *Plant Physiology and Biochemistry* i opisuje wyniki mające na celu weryfikację funkcji kinazy p38, należącej do kinaz MAP, w kontroli cyklu komórkowego roślin. Badania wykonane z zastosowaniem specyficznego inhibitora kinazy p38 komórek zwierzęcych. Inhibitor SB202190 nie znosił funkcji punktów kontrolnych, jakkolwiek jego obecność zwiększała dezintegrację materiału genetycznego w trakcie przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) indukowanej pod wpływem kofeiny. Inhibitor SB202190, jak również kofeina zmniejszały indukowaną hydroksymocznikiem acetylację lizyny 5 histonu 4. Uzyskane wyniki mogą sugerować udział szlaku kinaz MAP w funkcjonowaniu punktów kontrolnych z udziałem kinaz sensorycznych ATM/ATR w trakcie odpowiedzi komórek *Vicia faba* na stres genotoksyczny indukowany hydroksymocznikiem.

W trzeciej z prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pt: “ATM/ATR-dependent Tyr15 phosphorylation of cycline-dependent kinase in response to hydroxyurea in *Vicia faba* root meristem cells” opublikowanej również w czasopiśmie *Protoplasma* Doktorant wykazał, że zatrzymanie cyklu komórkowego w odpowiedzi na działanie hydroksymocznika związane jest z zależną od ATM/ATR inhibitorową fosforylacją tyrozyny 15 w kinazach cyklinozależnych. Uzyskane wyniki wskazują, że fosforylacja ta odgrywa kluczową rolę w fazie G1 i S, natomiast mniejsza liczba komórek zawierających fosforylowaną formę kinaz CDK (Tyr15), sugeruje, że podczas przejścia G2-M aktywność kinaz CDK może być regulowana przez inne mechanizmy.



Czwarta praca pt; "Drugi kod, czyli co determinuje regiony aktywności transkrypcyjnej oraz miejsca replikacji" została opublikowana w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* w 2009 r. Jest to praca przeglądowa, której niektóre elementy stanowiły zapewne inspirację do późniejszych, niezwykle wartościowych prac eksperymentalnych.

W trzech oryginalnych pracach eksperymentalnych mgr Winnicki jest ich pierwszym autorem, a w pracy przeglądowej jedynym. Z załączonych do rozprawy oświadczeń współautorów wynika jednoznacznie, że wkład doktoranta w powstanie i opublikowanie uzyskanych wyników był dominujący i wynosił od 80 do 85%.

W podsumowaniu recenzji, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej, bogaty warsztat metodyczny Doktoranta, oraz fakt że, uzyskane wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach stwierdzam, że rozprawa mgr Konrada Sz. Winnickiego spełnia wszystkie wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym i wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i metodyczną pracy, proponuję wyróżnienie Doktoranta stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Joanna Deckert

Poznań, dnia 3.06.2013