

Wrocław, 23 sierpnia 2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgra Marcina Pęzińskiego

pt. "Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of a dystrobrevin-1-interacting proteins and of extracellular matrix"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgra Marcina Pęzińskiego dotyczy tworzenia i przebudowy postsynaptycznej maszynierii w synapsie nerwowo-mięśniowej (NMJ), w tym roli białek towarzyszących α dystrobrevinie-1 oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Projekt doktorski został wykonany w dwóch pracowniach Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN: Pracowni Synaptogenezy oraz Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, pod kierunkiem specjalistów z dziedziny struktury oraz połączeń nerwowo-ruchowych mięśni szkieletowych, prof. dr hab. Marii Jolanty Rędownicz oraz dr hab. Tomasza Prószyńskiego.

Tkanka mięśniowa należy do grupy wysoce wyspecjalizowanych tkanek zwierzęcych, a jej właściwa funkcją jaką jest skurcz, przekładający się na ruch zwierząt, jest wynikiem wielu skomplikowanych procesów zachodzących w samym włóknie mięśniowym i informacji przekazywanej przez centralny układ mięśniowy (CUN). Połączenie włókna mięśniowego z CUN odbywa się poprzez synapsę nerwowo-mięśniową, która jest odpowiedzialna na prawidłową pracę mięśni. Kompleks ten tworzą liczne białka, których funkcja została dotychczas dość dobrze poznana. Wyniki badań uzyskanych w Zespole dr hab. Prószyńskiego sięgają głębiej w to zagadnienie i dowodzą, że tak nie jest, a struktura i funkcja białek w tym kompleksie nadal wymaga wnikliwych badań. Zaburzenia w przekazie informacji z CUN do mięśnia, powodowane są mutacjami genów kodujących białka budujące ten kompleks, co przekłada się na liczne choroby obserwowane u ludzi. Badania budowy molekularnej połączeń nerwowo-mięśniowych powinny stanowić kluczowe zagadnienie współczesnej biologii eksperymentalnej, tym samym przyczynią się poznaniu etiologii chorób związanych z zaburzeniami funkcjonowania synapsy nerwowo-ruchowej.

Dobrze poznanym kompleksem białkowym, który łączy cytoszkielet włókna mięśniowego z matrix zewnątrzkomórkową jest kompleks glikoprotein dystroglicanu (DGC) związanych z dystrofina. Znaczna liczba białek kompleksu DGC została poznana. Wcześniejsze badania prowadzone w Zespole dr hab. Prószyńskiego wykazały obecność dotychczas niepoznanego białka kompleksu DGC, alfa-dystrobrewiny-1 (α DB1). Dzięki spektrometrii mas zostały zidentyfikowane białka wiążące się z α DB1 (m. in. α -catulina, GRB2, lipryna- α -1, SH3BP2) pełniące ważną funkcję w organizacji postsynaptycznej maszynerii w NMJ (rozprawa doktorska mgra Krzysztofa Bernadzikiego, 2019). Projekt pracy mgra Pęzińskiego jest kontynuacją badań realizowanych w tym Zespole i dotyczy funkcji kolejnej grupy białek wiążących się z α DB1 jakimi są lipryna- α -1 oraz Tks5. Doktorant w swoim projekcie zawarł również badania związane funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej w prawidłowym funkcjonowaniu włókna mięśniowego.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim. Doktorant zamieścił w rozprawie streszczenie w języku polskim. Manuskrypt wraz ze streszczeniem oraz piśmiennictwem liczy 121 stron tekstu. Układ pracy jest prawidłowy i w pełni spełnia kryteria stawiane oryginalnym pracom naukowym. Opis skomplikowanych procesów wyjaśniających zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej oraz uzyskane wyniki, Autor pracy przedstawił na 32 rycinach. Wszystkie ryciny są czytelne i przejrzyste opisane. Uwaga do ryc. 21C i 22B, na osi współrzędnych Autor podał 1 %. Sądzę, że miał na myśli 100%

Ocena merytoryczna

Wstęp rozprawy doktorskiej jest rozbudowany i napisany „*ab ovo ad mala*”. W poszczególnych rozdziałach Autor pracy od zagadnień ogólnych przechodzi do szczegółowych, wprowadzając stopniowo czytelnika w problemy naukowe, które poruszone zostaną w dalszych częściach manuskryptu. Wstęp jest jakby „tłem” literaturowym przedstawiającym złożoność procesów poruszanych przez Doktoranta w projekcie. Dobrze zilustrowane i opisane schematy, które zostały zamieszczone w tej części rozprawy, wysoce ułatwiają zrozumienie zawartości procesów opisywanych w tekście.

Przystępując do realizacji projektu Doktorant założył trzy główne cele pracy badawczej obejmujące: badania mechanizmu regulacji postsynaptycznej w NJM poprzez lipirynę- α -1 oraz określenie roli Tks5 w rozwoju i integracji klastrów receptora acetylocholinowego (AChR). Trzeci cel pracy ma charakter metodologiczny i dotyczy opracowania warunków hodowli komórek mięśniowych w celu uzyskania kultur ze zwiększoną liczbą klastrów AChR.

Badania realizowane w projekcie Doktorant wykonał wykorzystując: linię mysich mioblastów (C2C12), pierwotną linię zdrowych ludzkich mioblastów, linię ludzkich komórek embrionalnych nerki oraz komórki wyizolowane z mięśni kończyny (*tibialis anterior*) myszy szczepu C57BL. Szeroka gama zastosowanych w badaniach metod takich jak: technika knockdown, przy zastosowaniu interferencyjnego RNA, koimmunoprecypitacja (pulldown), spektrometria mas, immunocytochemia, immunohistochemia, Western blot, pozwoliła Doktorantowi na uzyskanie ciekawych wyników.

W badaniach Doktorant wykazał, że wyciszenie lipryny- α -1 powoduje wyraźną redukcję klastrow AChR w postsynaptycznym obszarze NMJ. Jak przedstawił Autor pracy, obniżona ekspresja lipryny- α -1 nie wpływa jednak na ekspresję innego kluczowego białka maszynerii postsynaptycznej, jakim jest rapsyna. W celu wyznakowania pojedynczych receptorów AChR w miotubach z wyciszoną ekspresją lipryny- α -1, Doktorant wyznakował receptory AlexaFluor555-bungarotoxin (BTX555). Wynik tego badania jednoznacznie wykazał, że pojedyncze receptory obecne były w błonie postsynaptycznej, jednak nie wykazywały zdolności do tworzenia klastrow. Badanie to jednoznacznie potwierdziło, że receptory są dostarczane do błony komórkowej, jednak ich zdolność do tworzenia klastrow została wyraźnie zredukowana. Jak wiadomo było Doktorantowi lipryna- α -1 jest komponentem kompleksu LL5 β -CLASP odpowiedzialnego za regulację organizacji mikrotubul (MT). Przeprowadzona przez Doktoranta analiza immunocytochemiczna dowiodła silną kolokalizację AChR i LL5B. Kolejne badanie immunocytochemiczne na obecność MT wykazało, że w miotubach z obniżoną ekspresją lipryny- α -1 liczba mikrotubul kortykalnych została wyraźnie zredukowana. W celu określenia redukcji MT Doktorant przeprowadził badanie na mioblastach, a następnie miotubach barwiąc tylko końce MT poprzez białko1-EB1. Wynik tego doświadczenia jednoznacznie wykazał, że w mioblastach i miotubach z wyciszoną lipryną- α -1 liczba wyznakowanych końców MT znajdujących się w sąsiedztwie AChR jest zredukowana. Fakt ten pozwolił Doktorantowi na wyciągnięcie wniosku, że lipryna- α -1 jest związana z regulacją cytoszkieletu w miotubach. Ponadto Autor pracy przypuszcza, że brak klastrow AChR w komórkach z wyciszoną lipryną- α -1 nie jest wynikiem nieprawidłowej ekspresji tego receptora, czy jego transportu do błony, tylko brakiem zdolności receptorów do formowania klastrow w błonie. Aby tego dowieść Doktorant przeprowadził kolejne doświadczenie traktując miotuby nikodazolem, związkiem wpływającym na dezorganizację cytoszkieletu MT w komórce. Wynik tego doświadczenia jednoznacznie potwierdził słuszność hipotezy Doktoranta. Końcowym wnioskiem wszystkich powyższych eksperymentów było stwierdzenie, że wyciszenie lipryny- α -1 nie wpływa na zmianę ekspresji AChR, czy transport tych receptorów do błony. Lipryna- α -1 jest odpowiedzialna za organizację mikrotubul znajdujących się bezpośrednio pod AChR, dzięki którym receptory dostarczone do błony komórkowej są w stanie tworzyć charakterystyczne dla maszynerii postsynaptycznej klastry AChR.

Przeprowadzona analiza z zastosowaniem spektrometrii mas oraz metoda koimmunoprecypitacji wyłoniła nowego partnera α DB1, białko Tks5. Funkcja tego białka w kształtowaniu się postsynaptycznej maszynerii nie została dotychczas poznana. Dlatego też kolejnym celem pracy, realizowanym przez Doktoranta, było określenie roli Tks5 w rozwoju i prawidłowej organizacji klastrow receptora acetylocholinowego. Wyciszenie Tks5 w miotubach linii C2C12 nie spowodowało redukcji liczby klastrow AChR. Natomiast, Doktorant zaobserwował zmianę ich fenotypu, przejawiającą się brakiem podosomów, organelli bogatych w aktynę, odpowiedzialnych za przebudowę postsynaptycznej maszynerii. Wyciszenie Tks5 w miotubach linii C2C12 wpłynęło na niestabilność klastrow i ich

fragmentacją. Dynamika tworzenia się klastrow również uległa zmianie. Pomimo tego, że nowe receptory były dodawane, ich integracja z klastrem była nieprawidłowa i przypadkowa. Doktorant wykazał to poprzez inkubacje komórek z BTX555, w celu wybarwienia już istniejących klastrow oraz BTX488 wizualizując nowe receptory. Eksperyment ten jednoznacznie wykazał, że przy braku Tsk5 niewielka liczba nowych receptorów jest dokowana w klastrach, a same klastry nie podlegają prawidłowej przebudowie i tracą swoją integralność. Bazując na wiedzy, że przebudowa klastrow AChR regulowana jest przez elementy cytoszkieletu, Doktorant postawił zbadać udział mikrofilamentów oraz rolę białka Tks5 w tym procesie. W wyciszonych Tsk5 komórkach linii C2C12, Autor pracy, przeprowadził immunocytochemiczną detekcję rapsyny i β -aktyny w badanych komórkach. Wynik badań wykazał wyraźny spadek liczby interakcji rapsyny z aktyną. To pozwoliło Doktorantowi wyciągnąć wniosek, że Tsk5 jest niezbędnym białkiem w procesie łączenia się aktyny z postsynaptyczną maszyną, wpływając tym samym na jej stabilizację.

Trzeci i ostatni założony cel pracy dotyczył opracowania i optymalizacji nowej metody hodowli komórek mięśniowych, bazującej na pokrywaniu powierzchni hodowlanej różnymi izoformami lamininy, w celu uzyskania kultur ze zwiększoną liczbą klastrow AChR. Część ta stanowi rozbudowany rozdział Wyniki w dysertacji Doktoranta. Po uzyskaniu kultur komórkowych, Doktorant przeprowadził analizę morfometryczną miotub w hodowli, badał ich tempo różnicowania, w tym mechanizm rozwoju i przebudowy oraz tempo dojrzewania klastrow AChR. Analiza morfometryczna wykazała, że w zależności od użytej izoformy lamininy w hodowli, formowały się miotuby o większej średnicy, ze zwiększoną liczbą klastrow AChR. Autor pracy wykazał również, że indeks fuzji mioblastów jest zależny od rodzaju izoformy lamininy użytej w hodowli, co miało wyraźny wpływ na liczbę oraz mechanizm tworzenia się klastrow AChR. Doktorant zaobserwował, że w zależności od rodzaju użytej izoformy klastry tworzą struktury w kształcie litery C (poprzez mechanizm usunięcia dużej części receptorów z centrum klastra) lub przyjmują strukturę precla (w wyniku podosomalnej perforacji). W ostatnich rozdziałach Wyniki Doktorant przeprowadził powyższą analizę w pierwotnej hodowli ludzkich komórek mięśniowych. Podobnie jak w eksperymencie wykorzystującym linię C2C12, Doktorant wykorzystał różne izoformy lamininy i wykazał ich wpływ na formowanie się i przebudowę klastrow AChR. Ważnym odkryciem Doktoranta było zaobserwowanie w pierwotnej hodowli ludzkich komórek mięśniowych, oprócz charakterystycznych klastrow w kształcie płytki, formowanie się klastrow perforowanych. Wynik tego doświadczenia świadczy o tym, że klastry ulegają przebudowie z udziałem podosomów. Jak twierdzi Doktorant, ustalenie i optymalizacja warunków hodowli pozwoli na testowanie leków w przypadku chorób związanych z zaburzeniami NMJ. Sadzę, że tą częścią wyników Doktorant powinien podzielić się na łamach czasopisma typowo metodologicznego jakim jest JoVe.

Jestem pod dużym wrażeniem wyników uzyskanych przez Doktoranta. Każdy rozdział tej części dysertacji kończy się podsumowaniem, a kolejny rozdział jest kontynuacją kolejnego. Świadczy to, że Doktorant z dużą dbałością przystąpił do realizacji wysoce przemyślanego projektu, a sam projekt i jego

wyniki końcowo układają się w logiczną całość. W badaniach Doktorant wykorzystał już dobrze opracowane techniki, które były i są stosowane w Pracowni Synaptogenezy, to jednak wypracował on nowe metody, które zapewne będą miały duże znaczenie aplikacyjne w leczeniu chorób nerwowo-mięśniowych.

W ostatnim rozdziale Dyskusja Autor rozprawy podsumowuje wszystkie wyniki uzyskane podczas realizacji projektu doktorskiego. Ten rozdział dysertacji też mnie nie zawiodł. Doktorant precyzyjnie przedyskutował wszystkie uzyskane w projekcie wyniki wyciągając wnioski końcowe. W Dyskusji zawarte zostały wszystkie zagadnienia, które Autor ujął w celach pracy i właściwie zinterpretował w oparciu o dostępną literaturę. Omawiając w tym rozdziale wyniki swoich badań, Doktorant podkreśla, dotychczas niepoznaną rolę cytoszkieletu komórek mięśniowych w prawidłowym funkcjonowaniu NMJ. Dyskutuje również o przydatności w badaniach nowo opracowanej metody hodowli komórek, przy zastosowaniu różnych izoform lamininy, podkreślając tym samym ważną rolę elementów matrix zewnątrzkomórkowej w prawidłowym funkcjonowaniu komórek mięśniowych.

Podsumowując, główne cele pracy rozprawy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane przez Doktoranta. Wyniki są oryginalne i wartościowe, reprezentując tym samym poziom światowy. Autor rozprawy doktorskiej precyzyjnie wykonał szereg dobrze zaplanowanych eksperymentów, z których logicznie zostały wyciągnięte wnioski. Wyniki, które otrzymał Doktorant z pewnością przyczynią się do lepszego rozumienia mechanizmów działania maszyneryi postsynaptycznej w NMJ, a tym samym chorób związanych z dysfunkcją NMJ. Wartym podkreślenia jest również fakt, że Doktorant jest pierwszym autorem i współautorem w 4 oryginalnych publikacjach naukowych wydanych w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz kierownikiem grantu finansowanego przez NCN, Preludium pt. "The role of Tks5 protein in the organization of the muscle postsynaptic machinery." Grant no. UMO-2018/29/N/NZ4/02724.

Rozprawa doktorska mgra Marcina Pęzińskiego pt. *"Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of dystrobrevin-1-interacting proteins and of extracellular matrix"* spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgra Marcina Pęzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na duży wkład pracy Doktoranta, wagę i oryginalność uzyskanych wyników oraz Jego wysoki poziom przygotowania merytorycznego oraz metodycznego wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Małgorzata Daczewska





dr hab. Małgorzata Zimowska-Wypych

Warszawa, 23.08.2021

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej:

„Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of α -dystrobrevin-1- interacting proteins and of extracellular matrix” autorstwa Pana mgr Marcina Pęzińskiego.

Praca doktorska zrealizowana została w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, a jej promotorem była prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz.

Celem pracy było określenie roli białek oddziaływujących z α -dystrobreviną 1 (α DB1), białkiem będącym jednym z kluczowych elementów kompleksu dystroglikanu, odpowiedzialnym za zakotwiczenie maszynerii postsynaptycznej do filamentów cytoszkieletu oraz białek macierzy zewnątrzkomórkowej. W celu zrozumienia, w jaki sposób α -dystrobrevina 1 przyczynia się do organizacji i funkcjonowania maszynerii postsynaptycznej Autor rozprawy skupił się na identyfikacji oraz analizie funkcji dwóch, wcześniej nie opisywanych w tym kontekście białek oddziaływujących z α -dystrobreviną 1: lipriny- α -1 oraz białka Tks5.

Podczas realizacji badań opisanych w pracy doktorskiej analizowane były różne aspekty obecności i funkcjonowania badanych białek np. udział lipriny- α -1 w tworzeniu klastrów receptora acetylocholino (AChR) czy jej rola w organizacji mikrotubul znajdujących się bezpośrednio pod receptorem, identyfikacja białka Tks5 jako czynnika oddziałującego z α -dystrobreviną 1, udział Tks5 w formowaniu podosomów, czy jego rola w oddziaływaniach cytoszkieletu aktynowego z maszyną postsynaptyczną.

Praca, zawarta na 121 stronach maszynopisu, została zaprezentowana w formie klasycznej rozprawy, podzielonej na 7 głównych części typowych dla eksperymentalnych prac doktorskich. Rozdział Wstęp stanowi przekrojowe i czytelne wprowadzenie w zagadnienia, będące tematem pracy, a cel pracy został sformułowany jasno, dobrze uzasadniając podjęte badania na tle istniejącego stanu wiedzy. Doktorant zastosował szeroki zestaw metod badawczych, adekwatnych do celu pracy, opisując je w rozdziale Materiały i Metody, a rezultaty badań uzyskane z wykorzystaniem tych metod poddane zostały niezbędnym analizom statystycznym i przedstawione w rozdziale Wyniki. Zarówno wstęp zawierający tło prowadzonych badań, jak i dyskusja uzyskanych wyników zostały opisane w odniesieniu zarówno do

starszych prac, jak i najnowszej literatury dotyczącej opisywanych zagadnień. Doktorant wykorzystał blisko 230 pozycji bibliograficznych, których tematyka ściśle wiąże się z tematyką przedstawionej do recenzji pracy, prawidłowo je cytując. Realizacja projektu doprowadziła do powstania wielowymiarowej rozprawy doktorskiej dostarczającej po raz pierwszy danych wskazujących, że oba badane białka zaangażowane są w procesy związane z organizacją i funkcjonowaniem maszynerii postsynaptycznej. Dodatkowo, konieczność optymalizacji warunków hodowli komórek *in vitro* stanowiących materiał do opisanych badań przyczyniła się do stworzenia nowego protokołu hodowli komórek mięśniowych *in vitro* w celu uzyskania kultur ze zwiększoną ilością klastrow AChR, bazującą na pokrywaniu powierzchni hodowlanej alternatywnymi izoformami białka lamininy.

Wstęp do rozprawy doktorskiej w bardzo przystępny sposób wprowadza czytelnika w tematykę związaną z jednej strony z rozwojem, budową i funkcjonowaniem złącza nerwowo-mięśniowego, biorąc pod uwagę wszystkie elementy jego struktury zapewniające prawidłowe działanie, z drugiej w kwestie dotyczące zaburzeń jego funkcjonowania, przywołując kilka przykładów chorób neurodegeneracyjnych. Rozdział ten zawiera informacje istotne dla zrozumienia tematyki pracy i świadczy o rozległej wiedzy Doktoranta. Na uwagę zasługują czytelne, wyczerpująco podpisane i prawidłowo cytowane w tekście schematy, w sposób znaczący ułatwiające zrozumienie omawianych zagadnień. Niewielki niedosyt pozostawia jedynie sposób przedstawienia głównych bohaterów rozprawy: lipriny- α -1 oraz białka Tks5, którzy wspominani są w kontekście opisywanych zagadnień, nie doczekując się jednak, na co z pewnością zasługują, odrębnych podrozdziałów, podkreślających ich ważność i ułatwiających czytelnikowi podsumowanie ich znaczenia. Nie stanowi to jednak istotnej wady Wstępu, rozdziału zazwyczaj niezbyt łatwego do napisania, szczególnie w obliczu dużej ilości przedstawianych danych.

Rozdział **Materiały i Metody** obszernie prezentuje wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. Drobne zastrzeżenie mogą dotyczyć jedynie braku opisu procedury związanej np. z oceną indeksu fuzji (który to opis pojawia się dopiero w podpisie figury prezentującej te wyniki). Nie jest również jasne dla którego dnia hodowli przedstawiane są prezentowane wyniki indeksu fuzji. W opisie metod zabrakło również objaśnienia sposobu kwantyfikacji fluorescencji (które to opisy pojawiają się dopiero w legendzie figur). Nie jest również jasne w jaki sposób analizowano poziom ekspresji białek opisywany w tekście jako wyższy lub obniżony. Przedstawienie graficzne przedstawianego w rozdziale Wyniki pomiaru poziomu analizowanych białek ułatwiłoby z pewnością obserwację zmian, eliminując ewentualne wątpliwości dotyczące spadku/ wzrostu ilości badanego białka (np. Fig.14, poziom AChR). Nasuwa się również drobne pytanie proceduralne dotyczące pierwotnej hodowli komórek mięśniowych dotyczące liczby pasaży, którym podlegały te komórki w trakcie trwania eksperymentu.

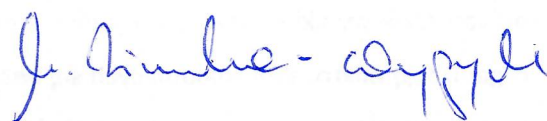
Rozdział **Wyniki** zawiera uporządkowany i konsekwentny w swoim przebiegu opis przeprowadzonych analiz oraz uzyskanych rezultatów bogato ilustrowany czytelnymi wykresami i bardzo

dobrej jakości zdjęciami. Uzyskane wyniki badań podzielone zostały na trzy części. W części pierwszej Doktorant opisuje wyniki związane z analizą lipryny- α -1, przedstawiając jej udział w regulacji zespołu maszynerii postsynaptycznej. Poczynając od ogólnego określenia, czy lipryna- α -1 pełni jakąkolwiek funkcję w specjalizacji postsynaptycznej, Doktorant przechodzi do coraz bardziej szczegółowych analiz związanych z wpływem zablokowania badanego białka na budowę i organizację maszynerii postsynaptycznej. W części drugiej opisany został udział białka Tks5 w kontekście badania mechanizmu przebudowy maszynerii postsynaptycznej, poczynając od identyfikacji Tks5 jako białka oddziałującego z α -dystrobrewiną 1, aż po określenie jego udziału w tworzeniu podosomów i modulowania oddziaływania cytoszkieletu aktyny z maszyną postsynaptyczną. Część trzecia wyników związana jest natomiast z doświadczeniami przedstawiającymi optymalizację warunków hodowli. Doktorant analizuje różne aspekty prowadzenia hodowli *in vitro* tak, aby uzyskać jak najlepsze, powtarzalne wyniki. Warto podkreślić, że Doktorant przeprowadził wszystkie badania bardzo skrupulatnie, kompleksowo opisując poszczególne etapy badań i uzasadniając konieczność podjęcia kolejnych kroków. W konsekwencji uzyskał bardzo ciekawe, nowatorskie wyniki wskazujące z jednej strony, że białko rusztowania lipryna- α -1 odpowiedzialne jest za organizację mikrotubul znajdujących się bezpośrednio pod AChR, dzięki którym receptory dostarczone do błony komórkowej są w stanie tworzyć charakterystyczne dla maszynerii postsynaptycznej skupiska znane jako klastry AChR, z drugiej, że białko Tks5 odpowiedzialne jest za tworzenie podosomów synaptycznych wewnątrz klastrow AChR, oraz za modulowanie oddziaływania cytoszkieletu aktyny z maszyną postsynaptyczną.

Kilka zagadnień wymagałoby jednak doprecyzowania. Nie jest np. w każdym punkcie jasne, który sposób zahamowania ekspresji zastał wykorzystany w danym doświadczeniu (np. Fig.15), w innym miejscu opisywany jako wykorzystujący siRNA oznaczone jako siRNA1, siRNA2 czy siRNA3. Nasuwa się również pytanie o wybór lamininy, do której odnoszone są wyniki pozostałych badanych izoform (nawet jeśli jest jedyną lamininą, jaką stosowano do stymulacji tworzenia klastrow AChR), skoro głównym składnikiem błony podstawnej dorosłego mięśnia szkieletowego wydaje się być laminina 211, a nie laminina 111.

Zwieńczeniem rozprawy jest, podzielona na kilka podrozdziałów adekwatnych do sposobu prezentacji wyników, **Dyskusja**. W rozdziale tym uzyskane rezultaty zostały podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań, w sposób świadczący o dojrzałości naukowej Doktoranta. Zaproponowane zostały również, co cenne, ewentualne kierunki kontynuowania badań. Szczególnie dyskusja związana z zagadnieniami związanymi z białkiem Tks5 wydaje się zasługiwać na uwagę. W konsekwencji Doktorant podsumowuje udział badanych białek proponując czytelny schemat oddziaływań pomiędzy głównymi bohaterami rozprawy, łączący udział lipryny- α -1 oraz białka Tks5 z α -dystrobrewiną 1 oraz różnymi elementami cytoszkieletu komórek, a najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych analiz znaleźć można w rozdziale **Posumowanie i wnioski**.

Podsumowując, pan mgr **Marcin Pęziński** realizując nowatorskie badania zrealizował postawione cele i udowodnił umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Prowadzone badania finansowane były przez dwa projekty (Preludium grant no. UMO-2018/29/N/NZ4/02724 oraz European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 665735) a ich rezultaty weszły w skład 4 publikacji naukowych. Otrzymane wyniki dostarczają obszernej i co istotne nowej wiedzy na temat roli białek oddziaływujących z α -dystrobreviną 1 w organizacji i funkcjonowaniu maszynerii postsynaptycznej, stanowiąc oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz.478, 619)** oraz załączniku nr 1. Regulaminu Rady Naukowej z 13.04.2018 r. i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Pęzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnioskując równocześnie o **wyróżnienie pracy**.





Wrocław, 02/09/2021

Ocena pracy doktorskiej Pana Marcina Pęzińskiego
pt. “Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of
adystrobrevin-1-interacting proteins and of extracellular matrix”

Pracę wykonano w Laboratory of Synaptogenesis oraz w Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem profesor Marii Jolanty Rędownicz oraz dr hab. Tomasza Prószyńskiego. Praca została przygotowana w języku angielskim.

Wstęp

Choroby nerwowo-mięśniowe człowieka, zarówno w aspekcie wiedzy o procesach regulujących formowanie się połączeń nerwowo-mięśniowych jak i ich modelowania w rozwoju oraz molekularnych aspektów funkcji i interakcji pomiędzy komponentami z nimi związanymi, jak i w aspekcie potencjalnych terapii stanowią wciąż nierozwiązany problem stojący przed nauką i medycyną chorób rzadkich. Nawet w przypadku relatywnie dobrze poznanych chorób nerwowo-mięśniowych jak rdzeniowy zanik mięśni (SMA – Spinal Muscular Atrophy), czy bliższe moim zainteresowaniom naukowym: EDMD4, ARCA1 (SCAR8), AMC3, mimo dotychczas zgromadzonego olbrzymiego zasobu wiedzy na ich temat, wciąż wiele aspektów tych chorób, szczególnie na poziomie molekularnym, pozostaje niezbadanych. Bardzo dobrą ilustracją problemów związanych z dogłębnym poznaniem mechanizmów rozwoju chorób nerwowo-mięśniowych jest fakt, że przy około 300 znanych chorób, opracowano jedynie skuteczne metody terapii na tylko jedną chorobę-SMA, w dodatku obie metodami terapii genowej



(Spinraza/Nusinersen oraz Zolengsma). Opracowanie skutecznych metod terapii dla pozostałych chorób nerwowo-mięśniowych dalej pozostaje wyzwaniem.

Dlatego badania zmierzające nad poznaniem molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie się połączeń nerwowo-mięśniowych oraz badania nad funkcją poszczególnych białek kompleksów białkowych formujących te połączenia jest niezwykle istotny dla rozwoju tej dziedziny oraz daje szansę na szybsze opracowanie skutecznych metod terapii.

Praca doktorska Pana Marcina Pęzińskiego jest moim zdaniem ilustracją faktu mówiącego o tym jak niewiele wciąż jeszcze wiemy na temat formowania chemicznej synapsy pomiędzy neuronem motorycznym a włóknem mięśnia szkieletowego (NMJ) oraz integracji dojrzewania funkcjonalnych kompleksów białkowych na neuronie i włóknie mięśniowym w trakcie rozwoju i w korelacji z miogenezą, a także jest próbą skutecznego podejścia do wypełnienia istniejących luk w naszej wiedzy. Praca wpisuje się w odpowiedni sposób we współczesne trendy badawcze nad różnymi aspektami biogenezy NMJ poprzez udane próby identyfikacji charakterystyki kluczowych elementów kompleksów białkowych odpowiedzialnych za formowanie NMJ po stronie post-synaptycznej.

Pracę wykonano w Zespołach, które od wielu lat z dużymi sukcesami zajmują się mechanizmami związanymi z formowaniem NMJ. Autor Rozprawy, w sekcji „Achievements” podaje listę czterech publikacji, w których jest współautorem lub pierwszym autorem oraz grant Preludium z NCN, którego jest laureatem (UMO-2018/29/N/NZ4/02724, który pozwolił Autorowi na sfinansowanie swoich badań.

Formalna ocena pracy

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została napisana w języku angielskim, składa się ze 121 numerowanych stron, 7-miu rozdziałów: Introduction-32 strony, Aims-2 strony, Materials & Methods-15 stron, Results-29 stron, Discussion-12 stron, Summary & Conclusions-1 strona, References-14 stron i 33 rycin w układzie i kolejności odpowiedniej i typowej dla rozpraw



doktorskich tego typu. Proporcje pomiędzy rozdziałami oraz zawartość rozdziałów są bardzo dobrze dobrane a zawartość merytoryczna przejrzysta i podana w interesujący sposób.

Autor posługuje się swobodnie i bardzo precyzyjnie zarówno językiem angielskim generalnie jak i językiem i terminologią naukową w tym języku. Wstęp pracy jest napisany bardzo umiejętnie, przejrzyste i pozwala na dogłębne zapoznanie się ze stanem wiedzy i problemami czekającymi wciąż na rozwiązanie. Autor szczególnie umiejętnie porusza się w gąszczu problematyki dotyczącej formowania NMJ ze szczególnym uwzględnieniem części postsynaptycznej. Przedstawione ilustracje są w większości w odpowiedniej, jakości, dokumentacja i legendy do rycin są w większości jasne i czytelne, wszystkie w podobnym stylu i układzie. Cel pracy jest jasno i precyzyjnie sformułowany. Bibliografia jest wyjątkowo rozbudowana i obszerna. Pozycje literaturowe są bardzo dobrze dobrane i odpowiednio cytowane.

Szczegółowa ocena pracy

Celem pracy było, jak podał Autor, osiągnięcie trzech celów:

- 1-zbadać mechanizm regulacji kompleksu postsynaptycznego przez białko liprin-alpha-1.
- 2-Okreslić rolę Tks5 w formowaniu i utrzymaniu kompleksów/klastrów AChR.
- 3-opracować efektywną i powtarzalną metodę formowania klastrów AChR in vitro

Dla realizacji zaplanowanego celu Nr 1, Autor przeprowadził wyciszenie lipriny-alpha1 z zastosowaniem siRNA w modelu różnicujących mioblastów C2C12 z zastosowaniem stymulacji klastrów AChR przez rozpuszczalną agrynę, uzyskując obniżoną liczbę klastrów. Następnie wykazał, że liprina-alpha1 reguluje liczbę mikrotubul kortykalnych w mioblastach C2C12 oraz miotubach oraz, że



spolimeryzowane mikrotubule są niezbędne dla formowania, czy raczej ekspansji klastrow AChR poprzez nieznany mechanizm.

Dla realizacji celu Nr 2, Autor, w oparciu o znaną funkcję białka Tks5 w formowaniu inwadosomów, przypominających strukturę podosomów synaptycznych, wykazał interakcję alphaDB1 z Tks5 metodą pull-down. Obniżenie poziomu Tks5 w mioblastach C2C12 metodą siRNA wykazało, udział tego białka w formowaniu w klastrach podosomów wizualizowanych poprzez spolimeryzowaną aktynę. Następnie metodą PLA, stosując przeciwciała na aktynę i rapsynę, Autor wykazał, że Tks5 jest niezbędny dla utrzymania kolokalizacji pomiędzy aktyną a rapsyną na błonie plazmatycznej miotub C2C12 (a nie tylko klastrow AChR).

Dla realizacji celu Nr.3, Autor testował zmienne parametry hodowli i różnicowania mioblastów C2C12 oraz formowanie klastrow AChR. Ponadto testował różne izoformy lamininy i ich wpływ na formowanie klastrow AChR oraz indeks fuzji.

W mojej ocenie największym osiągnięciem Autora jest wykazanie lipryny 1-alpha, jako nowego składnika klastrow AChR w części postsynaptycznej NMJ, jego interakcji z alfaDB1 oraz roli w formowaniu kortykalnej aktyny i podosomów NMJ.

Bardzo obiecującym wynikiem jest też wykazanie możliwości manipulacji efektywnością formowania struktur post-synaptycznych w modelu in vitro mioblastów i miotub C2C12 przez zmiany warunków hodowli oraz zastosowanie różnych izoform lamininy w hodowli. Interesującym, dla mnie osobiście, jest także fragment pracy dokumentujący różne modele badawcze in vitro dla oceny formowania się postsynaptycznego NMJ.

Mając na uwadze, wielką komplikację techniczną prowadzenia badań nad formowaniem się NMJ in vitro i in vivo oraz dodatkowy, olbrzymi problem wynikający z faktu, że obniżenie ekspresji każdego praktycznie z białek kompleksu



DGC lub białko oddziałującego powoduje zmiany poziomu innych komponentów białkowych kompleksu (np. w modelu mysim knockout jednego z sarkoglikanów powoduje utratę ekspresji pozostałych białek tego kompleksu), co powoduje konieczność mozolnej weryfikacji poziomu ekspresji innych komponentów, jestem pełen uznania, dla jakości i poziomu wykonanej pracy i przeprowadzonych badań.

Jednakże korzystając z przywileju, i obowiązku recenzenta, mam do Autora kilka pytań oraz uwag, szczególnie związanych z pierwszą częścią pracy doktorskiej.

Mam drobne zastrzeżenia, co do zawartości sekcji 1.2.3. Molecular Factors i kolejnych. Na przykład kwestia źródła i roli izoform Nrg w formowaniu NMJ ich roli w części postsynaptycznej, jako czynnika stymulującego ekspresję utrofiny oraz praktycznie pominiętej funkcji utrofiny w NMJ i MTJ.

Nie do końca rozumiem wspomnianą asocjację alfaDB1 z DM1, znam wiele genów korelowanych ze zmianami powtórzeń CTG w DMPK, ale jak rozumiem wskazana referencja do alfaDB1 to jedynie pojedyncza praca?

Czułem lekki niedosyt dostrzegając pominięcie roli Dvl w kanonicznym i niekanonicznym szlaku sygnalizacji przez beta kateninę.

Byłbym zobowiązany za wyjaśnienie, dlaczego akurat takie choroby genetyczne człowieka wybrał Pan do charakterystyki we wstępie. Przy okazji, nie do końca podzielam Pana optymizm w zastosowaniu utrofiny do leczenia DMD-problemem jest nie tylko poziom utrofiny, ale wzór glikozylacji białek kompleksu DGC warunkujący rekrutację utrofiny.

W część eksperymentalnej dotyczącej roli lipriny-alfa-1 zastanawia mnie czy prowadzono ocenę efektywności transfekcji siRNA w mioblastach i miotubach oraz kwestia relokalizacji i dyspersji AChR w błonie plazmatycznej dla siRNA 1 (Fig.13) w opozycji do pozostałych siRNA. Co z pozostałymi składnikami NMJ i lub DGC? Bazując na Fig 13 oraz Fig14B nie do końca zgadzam się z twierdzeniem, że wyciszenie nie zmienia poziomu białek postsynaptycznych NMJ- np. poziom AChR się znacząco zmienia na Fig14B. Nie znalazłem informacji, który siRNA został zastosowany w eksperymencie zilustrowanym na Fig15 a w związku z



różnicami w fenotypie pomiędzy siRNA jest to istotne dla interpretacji eksperymentu.

Ponieważ Fig 17 demonstruje wpływ lipryny na całkowitą ilość kortykalnych mikrotubul mam pytanie czy w eksperymencie z Fig 18 analizowano/porównywano ilość mikrotubul w obszarze NMJ w stosunku do „poza” NMJ?

W części dotyczącej Tks5 i analizy fenotypu po wyciszeniu ekspresji tego białka, czy następowały zmiany w poziomie innych białek kompleksu NMJ? Podobny fenotyp uzyskany przez wyciszenie dystrofiny wskazuje na prawdopodobną korelację. Przy eksperymencie zilustrowanym Fig23 prowadzono analizę intensywności i lokalizacji inkorporacji AChR technikami immunofluorescencyjnymi, nie do końca rozumiem sposobu kalkulacji i interpretacji danych - proszę o wyjaśnienie.

W przypadku większości eksperymentów z wyciszeniem Autor, stosował, jako metody oceny procedury i fenotypu techniki immunofluorescencyjne, testując efektywność i swoistość wyciszeni na łatwo transfekowalnych komórkach HEK293. Prosiłbym o wyjaśnienie przyczyn tej strategii eksperymentalnej.

Wnioski końcowe

Powyższe uwagi, sugestie i tematy do dyskusji na publicznej obronie rozprawy doktorskiej, w żadnym stopniu nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy, którą cechuje logiczny ciąg przyczynowo skutkowy zaplanowanych doświadczeń, naukowa dojrzałość, imponujący warsztat badawczy oraz duża swoboda w poruszaniu się w tematyce NMJ.

W moim przekonaniu niewątpliwą zaletą przedstawionej mi rozprawy doktorskiej jest bardzo dobry, oparty na najnowocześniejszych metodach warsztat badawczy, obejmujący takie biologii komórki jak: samodzielne przygotowanie zmodyfikowanych linii komórkowych, western blotting, mikroskopia immunofluorescencyjna, czy najbardziej skomplikowane analizy związane z analizą fenotypu *in vivo* oraz *in vitro*. Zarówno analizy typu histologicznego jak i funkcjonalnego. Czytając rozprawę odniosłem wrażenie, że Autor bardzo



swobodnie i z dużą wiedzą oraz umiejętnościami, także manualnymi i warsztatowymi, porusza się w tematyce badawczej swojej pracy. Natomiast przedstawiona rozprawa stanowi dobry punkt wyjścia do dalszych badań na mechanizmami molekularnymi i rolą białek postsynaptycznego NMJ w miogenezie w formowaniu NMJ w rozwoju oraz w korelacji z miogenezą.

Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana Marcina Pęzińskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r poz. 478,619) oraz załącznika nr 1 Regulaminu Rady Naukowej z dnia 13.04.2018r.

Zgłaszam, zatem formalny wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie Pana Marcina Pęzińskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Pracownia Białek Jądrowych
KIEROWNIK
prof. dr hab. Ryszard Rzepecki



Ryszard Rzepecki

Ryszard Rzepecki, Ph.D. D.Sc.,
Associate Professor
Laboratory of Nuclear Proteins
Faculty of Biotechnology, University of Wrocław
Street Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
www.nuclearproteins.com
ryszard.rzepecki@uwr.edu.pl
Animal Facility:
Przybyszewskiego Street 63/77
51-137 Wrocław, Poland