



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii

Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych

Prof. dr hab. Marek Maleszewski, Kierownik Zakładu Embriologii



Warszawa, 2 czerwca 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wpływ białka i ciałek jądrowych PML na morfologię jądra komórkowego neuronów oraz na funkcje kognitywne myszy” autorstwa pani mgr Gabrieli Olech-Kochańczyk

W ocenianej rozprawie doktorantka podjęła się zbadania tego czy białko PML i tworzone z jego udziałem ciała jądrowe PML odgrywają rolę w regulacji funkcjonowania hipokampa u dorosłych myszy. Ciała PML to jeden z typów ciałek jądrowych – nieobłonionych struktur występujących w obszarach międzychromatynowych jąder komórkowych. Ciała jądrowe i białka wchodzące w ich skład są zaangażowane w regulację całego szeregu procesów komórkowych, a białko PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*) jest niezbędnym składnikiem ciałek jądrowych PML. Znaczenie tych struktur w funkcjonowaniu komórek, w tym komórek ośrodkowego układu nerwowego ssaków jest dopiero poznawane, a wiedza na ten temat jest bardzo niekompletna, dlatego wybór celu pracy należy uznać za uzasadniony. Dla jego osiągnięcia doktorantka postanowiła uzyskać myszy zmodyfikowane genetycznie: z delecją genu *Pml* oraz myszy z podwyższoną ekspresją białka PML w mózgu. Te zwierzęta posłużyły następnie do badań behawioralnych mających wykryć ewentualny efekt zaburzeń poziomu PML na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Doktorantka podjęła się także skorelowania wpływu modyfikacji poziomu PM na strukturę jąder komórkowych neuronów hipokampa.

Po lekturze rozprawy stwierdzić można, że mimo pojawienia się trudności w realizacji tego planu, co oczywiście jest nieuchronne przy prowadzeniu nowatorskich badań wykorzystujących zaawansowane techniki biologii molekularnej i komórkowej, doktorantka z powodzeniem wywiązała się z podjętego zadania badawczego. Osiągnięcie zamierzonych celów nie przyszło jednak łatwo. Wyjściowo ambitnie zaplanowano, by dla uzyskania myszy z podwyższoną ekspresją PML skonstruować zwierzęta podwójnie transgeniczne z systemem Cre/loxP indukowanym tamoksyfenem specyficznym w komórkach mózgu. Zwierzęta takie udało się stworzyć, jednak nie wykryto, by u myszy tych poziom PML był wyższy niż w kontroli. Przyczyna tego niepowodzenia nie jest znana. I tu pojawia się pytanie: czy zbadano skuteczność systemu Cre/loxP w uzyskanych zwierzętach podwójnie transgenicznych? Autorka pisze co prawda, że dużą aktywność Cre-ER stwierdzono w linii użytej do krzyżowania, ale nie wiemy czy ta cecha utrzymała się także w krzyżówce podwójnie transgenicznej. Niepowodzeniem zakończyła się także następna próba, w której podwyższenie ekspresji PML w systemie Cre/loxP starano się wywołać u myszy pojedynczo transgenicznych, do hipokampu których wprowadzano gen rekombinazy Cre w wektorze

wirusowym AAV. W tym układzie nadekspresję badanego białka udało się uzyskać, ale stwierdzono, że w komórkach mózgu zwierząt eksperymentalnych lokalizuje się ono ektopowo – w cytoplazmie, a nie w jądrach komórkowych. Sukcesem zakończyła się dopiero próba, w której przeprowadzono transfekcję komórek hipokampa myszy typu dzikiego wektorem wirusowym niosącym gen *Pml* pod kontrolą promotora EF1 α . U tych zwierząt wykryto podwyższoną ekspresję PML, które wykazywało lokalizację jądrową. Takie myszy były użyte w badaniach behawioralnych i cytologicznych.

Dla uzyskania myszy z obniżoną ekspresją PML wykorzystano system CRISPR/Cas9 w dostępnych komercyjnie zwierzętach, ekspresujących endonukleazę Cas9 pod kontrolą systemu Cre/loxP. Do hipokampów takich myszy za pomocą wektorów wirusowych AAV wprowadzano odpowiednie gRNA i gen rekombinazy Cre pod kontrolą promotora specyficznego dla neuronów. Weryfikacja działania tego układu *in vivo* w hipokampie potwierdziła ok. 40% obniżenie poziomu mRNA genu *Pml*. Tak uzyskiwane także zwierzęta wykorzystano w dalszych badaniach. Tu nasuwa się pytanie: czy było możliwe, oprócz określenia ogólnego obniżenia poziomu ekspresji, stwierdzenie także tego w jak w licznej frakcji komórek hipokampa doszło do nokautu tego genu? Kolejna kwestia warta przedyskutowania, to zmienność poziomu wyciszenia zademonstrowana na rycinie 24. Wśród 13 przebadanych zwierząt mieści się ona w przedziale od ok. 0,2 do nawet ok. 1,2 w stosunku do średniej wartości dla kontroli. Zatem warto zadać pytanie jaki mogło to mieć wpływ na wyniki badań behawioralnych?

Badania behawioralne prowadzono w znakomitym systemie IntelliCage, który pozwala na automatyczną rejestrację oraz analizę zachowań, zdolności poznawczych i pamięci grup myszy przy minimalnej interwencji badaczy. Doktorantka wykazała, że obniżenie poziomu PML (nie była to pełna eliminacja tego czynnika, co błędnie napisano w wielu miejscach pracy, mówiąc o „delecji PML”!) w hipokampie pogarsza u myszy pamięć operacyjną i obniża próg lękowy, a nie wpływa na pamięć przestrzenną i proceduralną. Natomiast podwyższenie poziomu tego białka w badanym układzie nie miało wpływu na zachowanie myszy. W tej części pracy możliwości wnioskowania są jednak ograniczone ze względu na utratę znacznej części danych behawioralnych dotyczących tej grupy myszy doświadczalnych – bardzo szkoda, że tak się stało, bo niewykluczone, że jednak jakieś istotne różnice dałoby się zaobserwować.

Doświadczenia opisane w rozprawie uzupełniono o badania mikroskopowe jąder komórkowych neuronów hipokampa, które wykazały, że podwyższenie ekspresji PML znacząco zmienia strukturę chromatyny, zarówno w rejonach aktywnych transkrypcyjnie, jak i w tych w których transkrypcja nie zachodzi. Jednocześnie stwierdzono, że na poziomie mikroskopii optycznej (w tym fluorescencyjnej) nie stwierdzono, by eksperymentalnie wywołane obniżenie poziomu PML istotnie wpływało na organizację jądra komórkowego neuronów hipokampa. Nawiasem mówiąc, nie można tych obserwacji nazywać badaniem ultrastruktury jąder (str. 124), gdyż o tym możemy mówić dopiero, gdy stosowana jest mikroskopia elektronowa. Na zakończenie tego bardzo skrótowego opisu przeprowadzonych badań stwierdzić można, że mimo napotkanych trudności doktorantka z powodzeniem wywiązała się z podjętego zadania.

Oceniając samą rozprawę uważam, że doktorantka prawidłowo przedstawiła i przedyskutowała w niej przebieg i wyniki prowadzonych prac. Rozprawa ma tradycyjną formę,

typową dla eksperymentalnych prac dyplomowych. Rozpoczyna się od streszczenia w języku polskim i angielskim, a wstęp do niej to dobrze wyważone objętościowo wprowadzenie do zagadnień, które były przedmiotem zainteresowania doktorantki. Z tych rozważań logicznie wyłonił się następny rozdział rozprawy, w którym doktorantka przedstawiła cele pracy. Rozdział poświęcony materiałom i metodom jest bardzo obszerny i szczegółowo opisała zastosowane procedury stosowane w doświadczeniach. Stwierdzić należy również, że doktorantka udanie wywiązała się z zadania, jakim było przedstawienie uzyskanych wyników. Rozdział ten dobrze się czyta, po pierwsze ze względu na logiczne zorganizowanie materiału w rozdziały i podrozdziały, a po drugie dzięki prawidłowemu zilustrowaniu przez zamieszczone wykresy, zdjęcia i tabele, które są klarowne i pozwalają czytelnikowi samemu ocenić uzyskane rezultaty. W części rozprawy poświęconej dyskusji doktorantka prawidłowo zanalizowała uzyskane wyniki i przedyskutowała je na tle dostępnych danych literaturowych. Nie ograniczyła się tu tylko do zasadniczej kwestii rozprawy, czyli roli białka PML w funkcjonowaniu neuronów, ale także – wyciągając wnioski z własnego doświadczenia zgromadzonego podczas prowadzenia prac – przedyskutowała kwestie związane ze skutecznością różnych metod pozwalających na uzyskanie modyfikacji genetycznych u myszy. Kolejną część rozprawy stanowią podsumowanie i wnioski, w których doktorantka dobrze zebrała to, co udało jej się wykazać w badaniach przedstawionych w ocenianej pracy. Rozprawę zamyka prawidłowo sporządzona bibliografia. Na podkreślenie zasługuje to, że rozprawa jest zredagowana bardzo starannie, błędy edytorskie są naprawdę bardzo nieliczne.

Podsumowując, stwierdzić można, że rozprawa przedłożona do oceny spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630).

Prof. dr hab. Marek Maleszewski



Kraków, 27.06. 2022



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Elżbieta Pyza
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Olech-Kochańczyk pt. „Wpływ białka i ciałek jądrowych PML na morfologię jądra komórkowego neuronów oraz funkcje kognitywne myszy”

Jądro komórkowe komórek, a szczególnie neuronów, wciąż jest słabo poznane, ponieważ oprócz chromatyny, wykryto na jego terenie szereg struktur o kluczowym znaczeniu dla transkrypcji i procesów potranskrypcyjnych oraz procesów związanych z organizacją chromatyny. Jednymi z tych struktur wykrytych na terenie jądra komórkowego są ciała jądrowe zwane PML. Ciałkom tym przypisuje się wiele funkcji takich jak akumulacja czynników transkrypcyjnych i białek modyfikujących chromatynę, gromadzenie i uwalnianie białek w warunkach stresu, uszkodzenia DNA, infekcji wirusowej. Głównym białkiem tych ciałek jądrowych jest białko PML i kilka innych białek wstępujących z białkiem PML, które mogą być cięte, modyfikowane i degradowane w ciałkach PML. W bazie PubMed istnieje obecnie 1314 publikacji na temat ciałek PML, a tylko 71 dotyczy ciałek PML w neuronach. Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Gabrieli Olech-Kochańczyk jest więc ciekawy i aktualny, Swoje badania rozpoczęła pod kierunkiem ś.p. prof. dr. hab. Grzegorza Wilczyńskiego, a kontynuowała pod opieką dr. hab. Witolda Konopki (promotor) i dr Adrianę Magalskiej (promotor pomocniczy).

W rozprawie doktorskiej Doktorantka starała się zbadać wpływ białka PML i ciałek PML na jądro komórkowe neuronów w hipokampie po

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

manipulacjach genetycznych mających na celu zmniejszenie lub zwiększenie ilości białka PML. U tych samych zwierząt transgenicznych z podwyższonym lub obniżonym poziomem białka PML Doktorantka starała się wykazać jak zmiany te wpływają na uczenie się zwierząt poprzez zastosowanie wielu testów behawioralnych. Doktorantka napotkała wiele trudności podczas przygotowania odpowiednich zwierząt transgenicznych, a przeprowadzone badania nie wykazały wielu spodziewanych zmian w jądrze komórkowych i w zachowaniu myszy z grup doświadczalnych w porównaniu z kontrolą. Według informacji zawartej w rozprawie Doktorantka nauczyła się wszystkich procedur i samodzielnie wykonała doświadczenia. Osiągnięciem Doktorantki jest niewątpliwie otrzymanie genetycznie zmodyfikowanych myszy z podwyższonym poziomem oraz brakiem białka PML w neuronach hipokampa dorosłych myszy i wykazanie, że brak białka PML zmniejsza lęk i pogarsza pamięć operacyjną. Z kolei podwyższony poziom PML miał wpływ na organizację chromatyny.

Rozprawa doktorska liczy 155 strony i ma następujący układ: Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie, Abstract, Wstęp i cele badań (20 str.), Materiały i metody (36 str.), Wyniki (52 str.), Dyskusja (12 str.), Podsumowanie i wnioski (1 str.), Bibliografia (17 str., 199 pozycji). Na ostatniej stronie Doktorantka podała publikację, której jest współautorką, ale publikacja ta nie została przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w rozprawie.

We „Wstępie” pracy Doktorantka opisała strukturę jądra komórkowego, ciałek jądrowych PML, a także białko PML i jego funkcje w regulacji transkrypcji, odpowiedzi na stres i uszkodzenia DNA, w regulacji apoptozy, odpowiedzi na infekcję wirusową oraz w regulacji cyklu komórkowego. Kolejny rozdział poświęcony jest ciałkom PML i białku PML w układzie nerwowym, a szczególnie w hipokampie. Doktorantka opisała też budowę i funkcje hipokampa oraz metody uzyskiwania zwierząt transgenicznych. Wstęp jest dobrze napisany pod względem merytorycznym, jest wzbogacony 6 rycinami zapożyczonymi z innych publikacji, i dobrze wprowadza w tematykę rozprawy. Jednak Doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów. Pierwszy paragraf rozdz. 1.1 jest zbędny, albo powinien być

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

bardziej szczegółowy, bo bardzo ogólnie opisuje organelle komórki eukariotycznej, i to nie wszystkie. Poza tym napisano, że jądro komórkowe otoczone jest błoną nukleoplazmatyczną, a powinno być otoczone osłonką jądrową, która składa się z blaszki i błony jądrowej, a nie błoną nukleoplazmatyczną. Na terenie jąderka nie powstają rybosomy, ale ich podjednostki. Na stronie 15 Doktorantka napisała o mutacji białka PML, chociaż mutacje jak wiadomo dotyczą genów a nie białek. Na stronie 19-tej można się dowiedzieć, że PML aktywuje punkt kontrolny w cyklu komórkowym, ale nie ma informacji który, bo punktów kontrolnych jest kilka. Na stronie 23 podano, że geny *Per* i *Cry* są genami cyklu dobowego, a powinno być - genami molekularnego mechanizmu zegara okołodobowego. Ponadto w tekście znajdują się też niezręczne sformułowania takie jak: „białko lokalizuje się”, „materiał genetyczny”, „myszy z konstytutywnym usunięciem genu”, „habitat”, „nowe połączenia tkanki nerwowej w trakcie uczenia się”, „projekcje pochodzą także z jądra środkowego przegrody, które wysyła kwas cholinergiczny i kwas gamma-aminomasłowy”, „otrzymywanie linii zwierząt transgeniczných”, „korelacja między wielkością tylnej części hipokampa, a długością pełnienia funkcji kierowcy”. Doktorantka używa też terminu zapłodniony oocyt zamiast zygota oraz dzieli pracę na sekcje zamiast na rozdziały. W tekście można też znaleźć błędy literowe i ortograficzne.

Cel pracy został przedstawiony w trzech punktach: 1) wytworzenie zmodyfikowanych genetycznie myszy z wyższym poziomem białka PML lub jego brakiem, 2) analiza behawioralna tych myszy oraz 3) analiza zmian morfologicznych jądra komórkowego.

W rozdziale „Materiały i metody” szczegółowo opisano metody przygotowania myszy transgeniczných. Skład wszystkich mieszanin, warunków i użytych odczynników został podany w 18 tabelach. Doktorantka opisała wszystkie etapy doświadczeń, poczynawszy do hodowli bakterii, przygotowania wektorów wirusowych, transfekcji komórek, mikroiniekcji wektora do przedjądra męskiego zygoty, transferu zarodków do jajowodów samic, aż do genotypowania myszy transgeniczných. Metodyka zastosowana w pracy była bardzo pracochłonna a wydajność – uzyskanie pożądaných zwierząt modyfikowaných genetycznie przez wprowadzenie dsDNA do zygoty, dość niska, tylko 2,9%. Myszy transgeniczne, u których udało się

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

modyfikacje genetyczne, ze zwiększonym poziomem białka PML lub jego brakiem zostały poddane kognitywnym testom behawioralnym w klatkach IntelliCage. Testy te polegały na uczeniu się myszy doświadczalnych i kontrolnych wyszukiwania poidełek, sposobu uruchamiania poidełek czy uczenia się bodźca awersyjnego - test Vogla. W ostatniej części „Materiałów i metod” opisano przygotowanie preparatów do reakcji immunohistochemicznych, barwienia metodą DAB, obrazowania w mikroskopie konfokalnym oraz metody analizy ekspresji genów (RT-PCR, qPCR) i detekcji białek (Western blotting). Podsumowując, w pracy zastosowano wiele różnorodnych metod i technik badawczych, i zostały one bardzo dobrze opisane. Niewielkie błędy dotyczą pisowni, albo takich określeń jak „zamrożone próbówki” zamiast schłodzone do -80°C , czy np. że MnCl_2 został dodany przy użyciu filtra strzykawkowego, czy, że użyto jednokomórkowe zygoty lub zarodki w stadium jednokomórkowym.

Rozdział „Wyniki” jest najdłuższą częścią rozprawy i częściowo dalszym opisem metod: Indukcja podwyższonego poziomu białka PML u myszy podwójnie transgenicznych $\text{DIO-EF}\alpha\text{-PMLCaMKII}\alpha\text{-Cre-ERT}^2$. Na stronie 71 napisano, że „promotor czynnika elongacji $\text{EF1}\alpha$ wykazuje również pewien stopień neurospecyficzności”. Chciałabym się dowiedzieć co oznacza to stwierdzenie. W dalszej części opisano otrzymanie wektora $\text{DIO-EF}\alpha\text{-PML}$ i wyższego poziomu białka PML u zwierząt podwójnie transgenicznych indukowany tamoksyfenem. Wszystkie etapy procedur doświadczalnych były weryfikowane metodą Western blottingu i obrazowania w mikroskopie konfokalnym. Wyniki zostały opisane w sposób jasny, zrozumiały oraz przedstawione na 43 rycinach i w trzech tabelach.. Przedstawione na rycinach zdjęcia i wykresy zostały starannie przygotowane i są dobrej jakości. Tylko na dwóch rycinach ze zdjęciami zabrakło skali.

Ciekawym wynikiem jest uzyskanie podwyższonego poziomu białka PML w cytoplazmie neuronów hipokampalnych przez zastosowanie myszy transgenicznych $\text{DIO-EF}\alpha\text{-PML}$, po podaniu wektora wirusowego $\text{rAAV-CaMKII}\alpha\text{-Cre}$. Z kolei po podaniu wektora wirusowego $\text{rAAV-EF}\alpha\text{-PML-T2A-CherryNLS}$ do hipokampa myszy szczepu C57BL/6J uzyskano jądrową lokalizację PML.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kolejna procedura doświadczalna dotyczyła wytworzenia modelu myszy z knock-out *Pml*. z zastosowaniem systemu CRISPR/Cas9 i weryfikacja działania tego systemu.

W dalszej części wyników przedstawiono wyniki testów behawioralnych i zilustrowano je wykresami. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy myszami, u których poziom białka PML był wyższy, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi w teście clockwise i counter-clockwise. W teście uczenia się progresywnego uzyskano zaskakujący wynik, że nadekspresja PML i brak tego białka skutkuje w obu przypadkach niższą liczbą pokonanych poziomów w porównaniu z kontrolą. Z kolei testowanie aktywności (liczba prób picia wody) myszy PML-KO wykazała wzrost tego parametru w 5-tym dniu testowania, ale wynik ten był znacząco różny od dnia 4-go, a poza tym dla tej grupy, w 5-tym dniu, odchylenie standardowe od średniej wartości było znacznie większe niż w poprzednich dniach testu. Jak można wytłumaczyć ten wynik? W teście Vogla, w większości przypadków, też nie było różnic istotnych statystycznie, a zwierzęta doświadczalne z wyższym poziomem PML, jak również przy braku PML wykazywały podobne zmiany w porównaniu z kontrolą.

Analiza zmian morfologii jądra komórkowego neuronów hipokampalnych u zwierząt z wyższym poziomem PML lub brakiem PML nie wykazała wyraźnych różnic, poza zmianami ilości PML w jądrze komórkowym. Ciekawą kwestią jest wpływ większej ilości białka PML w jądrze komórkowym na rozmieszczenie chromatyny? Wygląda na to, że wysoki poziom PML nie upośledza funkcjonowania jądra komórkowego. Jak można to wyjaśnić?

W przypadku białka DAXX wyraźne różnice widoczne są na Ryc. 41B i 42B (kontrola), natomiast zdjęcia na Ryc. 41E (nadekspresja) i Ryc 42E wyglądają podobnie. Różnice pomiędzy kontrolą and zwierzętami PML-OE (Ryc. 43) i PML-KO (Ryc. 44) dla białka ATRX są niewidoczne. W legendzie Ryc. 43 wymieniono białko DAXX zamiast ATRX, a na zdjęciach tej ryciny brakuje strzałek. Wzrost poziomu PML miał też wpływ na modyfikacje białek histonowych – H3 (wykorzystano znacznik euchromatyny), natomiast brak PML nie miał wpływu na tę modyfikację. Podobny wynik uzyskano dla znacznika heterochromatyny fakultatywnej, a dla heterochromatyny

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

konstytutywnej zaobserwowano wzrost jej ilości u zwierząt ze zwiększonym poziomem PML w jądrze komórkowym neuronów zakrętu zębatego i brak różnic przy braku PML. Doktorantka zbadała również wpływ poziomu PML na białko splicesomu SRm300 stwierdzając, że PML ma wpływ na rozmieszczenie cętek jądrowych znakowanych SRm300. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego są dobrej jakości i można zauważyć różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi a kontrolą, ale dodatkowo dobrze byłoby zastosować analizę intensywności fluorescencji na otrzymanych obrazach.

Dyskusja zajmuje tylko 12 stron, ale Doktorantka we właściwy, przekonujący sposób przedyskutowała wyniki kolejnych eksperymentów, również te negatywne. Doktorantka twierdzi, że literatura dotycząca ciałek PML i białka PML w neuronach to tylko kilka publikacji. Ja znalazłam 73 takie publikacje. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę poszerzyły tę wiedzę, chociaż znaczącej roli PML w neuronach hipokampalnych nie udało wykazać. Niewątpliwym osiągnięciem Doktorantki jest przetestowanie różnych metod modyfikacji genetycznych u myszy w celu zmiany poziomu białka PML w neuronach. Co więcej sposób opisu metod i wyników uzyskania zwierząt transgenicznych dowodzi, że Doktorantka zna i samodzielnie wykonała wszystkie procedury. Wykonała też ogromną pracę stosując różnorodne testy behawioralne oraz analizując wpływ PML na strukturę jądra komórkowego, chromatynę aktywną i nieaktywną transkrypcyjnie oraz na kilka białek jądrowych. W Dyskusji wszystkie zastosowane procedury i wyniki, zarówno pozytywne, jak i negatywne są wyczerpująco omówione.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Olech-Kochańczyk jest bardzo dobrze napisana, zawiera ciekawe wyniki i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Gabrieli Olech-Kochańczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Pyza

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dnia 31.08.2022 r.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani magister Gabrieli Olech-Kochańczyk
pt. „Wpływ białka i ciałek jądrowych PML na morfologię jądra komórkowego
neuronów oraz funkcje kognitywne myszy”**

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Witolda Konopki i dr Adriany Magalskiej oraz śp. Profesora Grzegorza Wilczyńskiego w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej oraz w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej.

Biomolekularne kondensaty - struktury pozbawione błony, stanowią sporą grupę kompartmentów wewnątrzkomórkowych. Są one niezbędnymi strukturami umożliwiającymi komórce pełnienie istotnych funkcji życiowych w tym w odpowiedzi na stymulację i stres. Powstają w wyniku spontanicznej separacji faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS). Składają się zarówno z białek, jak i kwasów nukleinowych – głównie RNA. Ciałka PML będące przedmiotem tej pracy zbudowane są tylko z składników białkowych. Występują one w przestrzeniach między regionami bogatymi w chromatynę, a ich funkcja jest ściśle powiązana z aktywnością genów.

Ciałka PMLs są wielofunkcyjnymi organellami. Powstają w odpowiedzi na infekcję wirusową, związane są z naprawą uszkodzeń DNA, stresem oksydacyjnym i wieloma innymi czynnikami stresowymi. Formowanie kondensatu odbywa się m.in. dzięki wzajemnym oddziaływaniom białek PML. Ważne dla tego procesu są także modyfikacje

posttranslacyjne białka markerowego - sumoilacja PML. Ciałka PML są często zlokalizowane w miejscach aktywnych transkrypcyjnie oraz służą jako rezerwuar wielu innych białek jądrowych. Jak do tej pory nie zbadano roli tych struktur w prawidłowym funkcjonowaniu dojrzałego mózgu ssaków. Ze względu na zróżnicowane funkcje tych białek, ciałka jądrowe i białko PML są pośrednio zaangażowane w szereg procesów, które mogą mieć istotny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie mózgu zwierząt i człowieka. Wysoki poziom białka PML występuje w hipokampie, strukturze związanej z uczeniem się i pamięcią. Dlatego też zbadanie wpływu tych biomolekularnych kondensatów na funkcje kognitywne dorosłych osobników ssaków podjęte w rozprawie doktorskiej Pani magister Gabrieli Olech-Kochańczyk uważam za ważne i bardzo interesujące zadanie. Uzyskanie wiarygodnych danych eksperymentów okazało się zadaniem bardzo wymagającym. Autorka dysertacji poradziła sobie znakomicie pomimo wielu trudności w trakcie aplikacji szeregu metod i technik, których wyniki były „ślepą ścieżką”, nie prowadzącą do celu.

Układ pracy jest zgodny z zasadami redagowania rozpraw doktorskich. Treść odpowiada tematowi określone w tytule. Rozprawa została podzielona na standardowe w pracach biologicznych rozdziały.

Wstęp i dyskusja ocenianej pracy doktorskiej zostały opracowane przez Panią mgr Gabriellę Olech-Kochańczyk na podstawie licznych pozycji literaturowych. Wstęp liczący 20 stron, na początku krótko wprowadza w opis architektury i funkcjonalnej budowy jądra komórkowego, jego domenowej struktury z szczególnym uwzględnieniem ciałek PML. Dalsza część wstępu dotyczy szczegółowych zagadnień związanych z tym kompartmentem jądrowym szczególnie w układzie nerwowym. Wstęp jest syntetycznie napisany i stanowi świetne wprowadzenie do badań. Postawiony na końcu wstępu cel pracy jest bardzo ambitny, a uzyskane wyniki są w pełni oryginalne i ciekawe. Część rozprawy dotycząca stosowanych przez Autorkę dysertacji materiałów i metod opisana jest z dokładnością wystarczającą do powtórzenia eksperymentów, bez nadmiernej szczegółowości, z dbaniem o sedno sprawy. Zarówno wstęp jak i materiał i metody ilustrowane są tabelami i rycinami dobrze ilustrującymi treści zawarte w tych rozdziałach. Najobszerniejszą część rozprawy stanowi opis wyników badań.

Znacząca część tego rozdziału przedstawia żmudną drogę w celu uzyskania odpowiedniego eksperymentalnego modelu badawczego, który pozwoli zbadać zarówno zmiany morfologii jądra komórkowego neuronów z modyfikacją poziomu białka PML jak i przeprowadzenie analizy zmian behawioralnych u myszy.

Ta metodyczna część wyników zasługuje na szczególną pochwałę.

W pierwszym wariancie doświadczeń Autorka prowadząc szereg kontroli specyficzności uzyskała z powodzeniem myszy podwójnie transgeniczne z globalną neurospecyficzną indukcją ekspresji białka PML w mózgu. Wykorzystano system Cre/loxP. Uzyskano pozytywny wynik transfekcji plazmidami i prawidłowe działanie systemu Cre/loxP *in vitro*. Autorka uzyskała samice myszy linii transgenicznych. Pomimo poprawnie i rzetelnie wykonanego udanego doświadczenia, analiza ekspresji białka PLM w hipokampie w 3-miesięcznych myszy wykazała, że poziom białka PML u myszy podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} indukowanych tamoksifenem, nie różni się istotnie od poziomu tego białka u myszy kontrolnych w hipokampie i innych strukturach mózgu. W dalszej części wyników opisano wyniki alternatywnych doświadczeń prowadzących do uzyskania neurospecyficznego, lokalnie podwyższonego poziomu PML w mysim hipokampie z użyciem wektora wirusowego rAAV, wprowadzonego bezpośrednio do hipokampa zwierząt.

Przeprowadzono dwa typy eksperymentów, z różnymi wektorami. W pierwszym modelu otrzymano cytoplazmatyczną lokalizację białka PML w komórkach hipokampu w drugim lokalizację jądrową. Z uwagi na uzyskanie cytoplazmatycznej lokalizacji białka PML przy użyciu jądrowej izoformy białka PML, w dalszej części badań badano myszy z podwyższonym poziomem białka PML o lokalizacji jądrowej. Przeprowadzono efektywną iniekcję wektora wirusowego, stosując niskie jego stężenie, które umożliwiły jego prawidłową i efektywną dyfuzję w całej strukturze hipokampa. Już wstępne badania nie wymagające barwienia immunohistochemicznego przez zastosowanie jako markera białka mCherry potwierdziły pełną użyteczność otrzymanego modelu, z lokalnie podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie.

Powodzeniem zakończyło się również otrzymanie modelu myszy z efektem delecji białka PML w hipokampie myszy. Dotychczas badania opisane w literaturze dotyczące efektu usunięcia białka PML w mózgu przeprowadzono na modelu myszy z jego konstytutywnym brakiem. W przedstawionej pracy uzyskano model myszy z indukowaną, neurospecyficzną delecją genu PML w hipokampie dorosłych zwierząt. Wybrany przez autorkę wariant indukowanego „knock-out’u” genu PML w hipokampie dawał możliwość wyboru momentu aktywacji wprowadzanych zmian w mózgu w kontrolowanych warunkach. W tym celu wykorzystano system CRISPR/Cas9 zawierający Cre-zależną ekspresję endonukleazy Cas9. Weryfikację skuteczności przeprowadzona na poziomie mikroskopowym i molekularnym potwierdziła, że uzyskano istotną redukcję ekspresji białka PML w hipokampie.

Oba modele badawcze z podniesionym poziomem białka PML w komórkach hipokampu i efektywnym spadkiem jego ekspresji pozwoliły dalej Autorce na przeprowadzenie analizy zamian behawioralnych u myszy w obu modelach w porównaniu do kontroli. Dały również możliwość na analizę zmian poziomu i lokalizacji różnych białek wchodzących w skład ciałek jądrowych PML. Przeprowadzono także badania wpływ modyfikacji poziomu białka PML na posttranslacyjne modyfikacje białek histonowych w jądrze komórkowym neuronów hipokampalnych jak i pośredniego wpływu na splicing.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- Stworzenie modeli genetycznie zmodyfikowanych myszy z podwyższonym i obniżonym poziomem białka PML, w których modyfikacje były indukowane bezpośrednio w mózgu u dorosłego zwierzęcia w wybranym momencie.
- Wykazanie, że obniżony poziom białka PML w hipokampie wpływa negatywnie na pamięć operacyjną oraz obniża próg lękowy zwierząt. Przy podwyższonym poziomie tego białka nie obserwowano żadnej istotnej zmiany.
- Przeprowadzone testy wykazały jednocześnie, że zmiany poziomu białka PML w hipokampie nie zaburzyły formowania pamięci przestrzennej i proceduralnej.
- Wykazanie, że w przeciwieństwie do testów behawioralnych, które wskazywały znaczący wpływ delekcji genu na zachowanie zwierząt laboratoryjnych, zmiany morfologiczne, lokalizacja białkowych partnerów białka PML oraz zmiany konformacji aktywnej i nieaktywnej chromatyny obserwowane są przy podniesionym, a nie przy obniżonym poziomie białka PML w neuronach hipokampa.

Uwagi:

Badania przedstawione w tej rozprawie wpisują się w najlepszy nurt badań eksperymentalnych biologii komórki. Należy podziwiać zaplanowanie oraz logikę prowadzonych kolejnych eksperymentów, które pozwoliły na uzyskanie bardzo ciekawych wyników. Wyniki te pozwalają na zadanie jeszcze ciekawszych dalszych pytań, które stawia Autorka w rozdziale Dyskusja i wysunięcie nowych hipotez na temat regulacji ekspresji w jądrze komórkowym.

Na koniec mam do Autorki tej rozprawy jeszcze kilka drobnych pytań/uwag:

- W rozdziale materiał i metody, opisano użycie przeciwciał do lokalizacji białek PML w metodzie immunofluorescencyjnej. W opisie np. Ryciny 41 czy 42 Autorka prawdopodobnie używała jednak detekcji samego białka fuzyjnego mCherry-PML (oba typy przeciwciał są mysie (PML/DAXX) co wykluczałoby możliwość takiej ko lokalizacji immunofluorescencyjnej. Czy jednak przy innych lokalizacjach były używane przeciwciała do lokalizacji białka PML, gdy było to możliwe kiedy drugie przeciwciała pierwotne nie pochodziły od myszy. W dyskusji Autorka pisała o pewnej niespecyficzności tych przeciwciał. Proszę o wyjaśnienie tych moich drobnych wątpliwości

- Dlaczego w kolokalizacji z białkiem DAXX nie użyto innych przeciwciał wtórnych z markerem np. Alexa 633 co wykluczyło by potencjalne resztkowe świecenie białek GFP utrudniających analizę lokalizacji białka DAXX (rycina 42).

- W opisie ryciny 46 Autorka pisze: „PML zlokalizowany jest wokół centralnych obszarów jądra, a euchromatyna jest spychana na peryferie jądra komórkowego (co dobrze widoczne było również na skanie jąder w osi Z). Ze względu na wypełnienie przestrzeni jądra komórkowego białkiem PML, w jądrach komórkowych PML-OE euchromatyna zdaje się być bardziej upakowana” Jądro komórkowe wypełnione jest tysiącami białek swobodnie przemieszczających się przez większość jego objętości. Trudno mi sobie wyobrazić takie fizyczne „spychanie aktywnej chromatyny” na peryferie jądra. Proszę o komentarz w tej sprawie.

- Na stronie 121 opisując wyniki lokalizacji białko spliceosomu, SRm300 Autorka użyła zwrotu: „Białko SRm300 jest jednym z białek wchodzących w skład spliceosomu – kompleksu białek i RNA biorącego udział w wycinaniu intronów z pre-mRNA w procesie redagowania mRNA” Wydaje mi się, że zostało tu użyte w tym miejscu zbyt swobodnego znaczenia słowa redagowanie, które odnosi się do innego postranskrypcyjnego procesu modyfikacji RNA, a sądzię, że chodziło po prostu o proces splicingu?

- Drobne błędy edytorskie w tekście czy numeracji np. stron w spisie treści, które są nie do uniknięcia przy tak obszernym tekście.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani magister Gabrieli Olech-Kochańczyk zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do prowadzenia badań. Wyszczególnione drobne uwagi wynikają z obowiązku recenzenta i nie mają one wielkiego wpływu na wysoka ocenę pracy.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska 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 2016 r. poz.882) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani magister Gabrieli Olech-Kochańczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą wnoszoną do istniejącej wiedzy ważne fakty o roli białek PML, uznaję pracę za wyróżniającą się i pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK