

Kraków, 8.02.2024



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 Dagmary Holm-Kaczmarek
pt. „Rola białka ATRX w organizacji chromatyny neuronów
hipokamplanych szczura”, której promotorami są: dr hab. Adriana
Magalska i prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz. Praca została wykonana
w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systematycznej oraz w
Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów komórkowych Instytutu Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie**

Rozprawa doktorska mgr Dagmary Holm-Kaczmarek dotyczy aktualnego problemu naukowego, jakim jest poznanie zmian zachodzących w jądrze komórkowym neuronów hipokamplanych w czasie pobudzenia i mechanizmu tych zmian, które mają kluczowe znaczenie dla ich funkcjonowania. Mgr Dagmara Holm-Kaczmarek zbadała lokalizację i funkcję białka ATRX w jądrze komórkowym neuronów w fazie spoczynkowej i po stymulacji przez cLTP.

Ocena ogólnej wiedzy teoretycznej

We Wstępie rozprawy (24 strony) mgr Dagmara Holm-Kaczmarek przedstawiła szereg zagadnień dobrze wprowadzających w tematykę pracy, które świadczą o szerokiej wiedzy autorki od informacji podstawowych do szczegółowych. Opisała budowę neuronu, zjawisko plastyczności synaptycznej w mózgu, morfologię jądra komórkowego i jąderka oraz scharakteryzowała główne białka jąderkowe (nukleolinę, UBF, B23). Ponadto opisała stres jąderkowy i znaczenie procesów jąderkowych dla

30-387 Kraków
ul. Gronostajowa 9
tel.: 12 664 53 37
fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

funkcjonowania neuronów. We Wstępie znajduje się też opis modyfikacji strukturalnych chromatyny, mechanizmów regulujących ten proces oraz białek m.in. ATRX (alpha thalasemia mental retardation syndrom X-link), które uczestniczą w modyfikacjach chromatyny. Informacje zawarte we Wstępie wskazują na dużą wiedzę Doktorantki i umiejętność jej przedstawienia. Zbyt ogólnie przedstawiono jednak mechanizm plastyczności synaptycznej. Nie zgadzam się też z twierdzeniem, że laminy blaszki jądrowej nadają osłonce jądrowej elastyczność, że w środku jąderka jest centrum granularne, i że biosynteza rybosomów zachodzi w jąderku, bo dotyczy to podjednostek rybosomalnych, a nie rybosomów. Uważam też za nieprecyzyjne określenia „geny palca cynkowego” i „ciało genów”. Są to drobne błędy, które nie wpływają na moją bardzo dobrą ocenę wiedzy teoretycznej Doktorantki. Taką wiedzę Doktoranta również wykazała się pisząc rozdział Dyskusja (10 str.), w którym przedyskutowała otrzymane wyniki z adekwatnymi wynikami innych autorów. W rozprawie zacytowano 119 pozycji literatury, które świadczą o dobrej znajomości przez Doktorantkę tematyki, która jest przedmiotem rozprawy.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia badań

Doktorantka postawiła hipotezę, że białko ATRX bierze udział w organizacji chromatyny pod wpływem pobudzenia. Tę hipotezę weryfikowała przez analizę lokalizacji ATRX w jądrze komórkowym neuronów w stanie spoczynkowym i po chemicznym pobudzeniu wywołującym długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP), zbadanie czy ATRX zaangażowane jest w modyfikacje potranslacyjne histonów i czy obniżenie poziomu ATRX powoduje zaburzenia organizacji chromatyny, morfologii struktur jądrowych i neuronów. Badania zostały właściwie zaplanowane przez Doktorantkę. Do badań zastosowała odpowiednie metody. Lokalizację ATRX badała w neuronach hipokampa szczura w hodowli *in vitro*, w skrawkach hipokampa w hodowli organotypowej z wykorzystaniem znakowania immunohistochemicznego i mikroskopii konfokalnej. Do wyciszenia genu *Atrx* zastosowała wektor plazmidowy z shRNA i cDNA kodujące GFP. LTP wywoływała chemicznie przez zastosowanie mieszaniny forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny. W badaniach zastosowała też inne metody jak technika Western Blot, elektrofizjologia techniką whole-cell patch-clamp, przygotowanie plazmidów i transfekcja neuronów metodą lipofekcji, transdukcja neuronów wektorem wirusowym. W mikroskopie konfokalnym oprócz obrazowania neuronów Doktorantka przeprowadziła pomiary intensywności fluorescencji dla

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

różnych markerów, analizę kolokalizacji ATRX i innych białek. Wszystkie metody są dokładnie opisane w rozprawie i świadczą o ich dobrym opanowaniu przez Doktorantkę i samodzielnym przeprowadzeniu badań. Opis uzyskanych wyników i ich zilustrowanie na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego, również dowodzi dobrego opanowania technik badawczych i samodzielnego przeprowadzenia badań.

Na podstawie założonych celów badawczych, zaplanowania metod przedstawionych w rozprawie i wykorzystanych w badaniach, mogę stwierdzić, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Ocena rozprawy doktorskiej, jako oryginalnego rozwiązania problemu naukowego

W rozprawie doktorskiej zawarto oryginalne wyniki, istotne dla poznania znaczenia modyfikacji chromatyny w stanie spoczynkowym i po pobudzeniu neuronów hipokampalnych, w której bierze udział białko ATRX.

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Doktorantka wykazała, że ATRX występuje w jądrze komórkowym badanych neuronów hipokampa, w stanie spoczynkowym z heterochromatyną, a po cLTP z euchromatyną, która jest aktywna transkrypcyjnie. Obniżenie poziomu ATRX po wycieszeniu genu *Atrx*, wywołuje wzrost kondensacji chromatyny i wpływa na morfologię neuronów (zmniejszenie liczby dendrytów). Po raz pierwszy Doktorantka wykryła obecność ATRX w jąderku, w miejscach nazwanych przez Autorkę ciałkami ATRX. Wykazała, że liczba i położenie ciałek ATRX zmienia się w zależności od pobudzenia neuronów (cLTP) i w warunkach stresu. Stwierdzenie roli białka ATRX w organizacji chromatyny w jądrze komórkowym neuronów i wpływ na morfologię neuronów jest ważnym odkryciem i wskazuje na rolę białka ATRX w plastyczności neuronalnej.

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Uwagi

Praca została starannie przygotowana pod względem graficznym, jest napisana w sposób jasny i zrozumiały, jednak w tekście zdarzają się błędy literowe, stylistyczne a nawet ortograficzne. Niektóre terminy jak wiązania hydrofobowe są nieprawidłowe, a mogą to być oddziaływania hydrofobowe, a wiązania są np. wodorowe, kowalencyjne.

30-387 Kraków

Proszę również o wyjaśnienie, co oznacza następujące zdanie na str. 67: „Po pobudzeniu dochodzi do zmiany wzoru metylacji histonu, modyfikacja ta staje się

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

bardziej skupiona, zwłaszcza w obszarach przy skondensowanej chromatynie”. Czy po cLTP nie powinna się zmniejszyć ilość skondensowanej chromatyny?

Podsumowanie

Wiedza teoretyczna Doktorantki, wyniki badań uzyskane w czasie prowadzenia badań zawarte w rozprawie doktorskiej oraz oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było poznanie roli białka ATRX w funkcjonowaniu neuronów, pozwalają na bardzo dobrą ocenę rozprawy doktorskiej mgr Dagmary Holm-Kaczmarek.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Rozprawa doktorska mgr Dagmary Holm-Kaczmarek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

i Badań Biomedycznych

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Dagmary Holm-Kaczmarek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Elżbieta Pyza

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii, Zakład Biologii Molekularnej
dr hab. Agnieszka Girstun



SEKRETARIAT RADY NAUKOWEJ
WPŁYNEŁO 22.02.2024

Warszawa, 20.02.2024

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Dagmary Holm-Kaczmarek
pt. „Rola białka ATRX w organizacji chromatyny neuronów hipokampa mózgu szczura”.**

Mgr Dagmara Holm-Kaczmarek wykonała swoją pracę doktorską w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej oraz w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem dwóch Pań promotor: dr hab. Adrian Magalskiej i prof. dr hab. Marii Jolanty Rędownicz.

Recenzowana rozprawa ma klasyczny układ i składa się z ośmiu rozdziałów: 1) Wstęp; 2) Założenia i cele pracy; 3) Materiały; 4) Metodologia; 5) Wyniki; 6) Dyskusja; 7) Podsumowanie i wnioski; 8) Bibliografia. Zwracam uwagę, że rozdział nr 4 powinien nosić tytuł „Metody”, a nie „Metodologia” (nauka o metodach badań naukowych). Pracę uzupełniają: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz spis publikacji i doniesień zjazdowych Doktorantki. Całe opracowanie liczy 119 stron i zawiera 13 tabel oraz 42 bardzo dobre ryciny, z których 35 przedstawia wyniki badań Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Organizacja przestrzenna chromatyny jest jednym z kluczowych czynników regulujących ekspresję genów na poziomie transkrypcji. Pobudzenie komórek nerwowych prowadzi do znaczącej zmiany ich transkryptomu, jednak wpływ pobudzenia neuronalnego na strukturę chromatyny pozostaje słabo scharakteryzowany. Do białek remodelujących chromatynę i istotnych dla prawidłowego rozwoju neuronów należy ATRX. Rola ATRX w odpowiedzi neuronów na pobudzenie synaptyczne nie została do tej pory opisana w literaturze. Realizując swoją pracę doktorską, mgr Holm-Kaczmarek postawiła hipotezę, że białko ATRX bierze udział w reorganizacji chromatyny po pobudzeniu synaptycznym. Aby zweryfikować tę hipotezę, mgr Holm-Kaczmarek sformułowała kilka szczegółowych celów badań, które zakładały przede wszystkim: i) określenie lokalizacji ATRX w jądrach komórkowych neuronów w stanie spoczynku i po pobudzeniu; ii) analizę powiązania rozmieszczenia ATRX z określonymi modyfikacjami posttranslacyjnymi histonów charakterystycznymi dla aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny; iii) analizę wpływu obniżenia zawartości komórkowej ATRX na strukturę chromatyny i morfologię neuronów.

Przedstawioną do recenzji rozprawę otwiera **Wstęp**, który przekrojowo przedstawia kontekst badań opisanych w dalszej części pracy. Autorka najpierw wprowadza czytelnika w tematykę plastyczności synaptycznej, roli neuronów hipokampalnych i aktualnych poglądów na budowę jądra komórkowego oraz charakterystyki i funkcji jąderek, a następnie przechodzi do omówienia zagadnień bezpośrednio związanych z prowadzonymi badaniami, czyli mechanizmów kontrolujących strukturę chromatyny oraz funkcji białka ATRX. Mgr Holm-Kaczmarek dobrze poradziła sobie z ujęciem tak zróżnicowanych zagadnień w skondensowanej formie. Szeroko zakrojona tematyka poruszana we Wstępie wymusza skrótowość opisu, ale przytoczone informacje są wystarczające do zrozumienia dalszej części rozprawy. Zabrakło mi jedynie omówienia opublikowanych w 2022 r. wyników badań zespołu, w którym Doktorantka wykonywała swoją pracę. Badania te pokazały, że podczas pobudzenia neuronów dochodzi do globalnej reorganizacji struktury chromatyny, co stało się jedną z podstaw sformułowania hipotezy badawczej. Wyniki, o których mowa, zostały tylko jednozdaniowo wspomniane w rozdziale Założenia i cele pracy, a omówione dopiero w dalszej części rozprawy (Wyniki, Dyskusja). Dokładniejsze opisanie ich przed sformułowaniem hipotezy, ze wskazaniem, jakie luki w wiedzy wymagają uzupełnienia, wzmocniłoby argumentację uzasadniającą podjęcie opisywanych badań.

W czasie lektury Wstępu nasunęło mi się kilka uwag, które wypunktowałam poniżej:

1. Thomas Cremer i wsp. proponują model organizacji jądra komórkowego opierający się na jego podziale na dwa przedziały: aktywny i nieaktywny, Zgodnie z tym modelem przestrzeń międzychromatynowa (inaczej: interchromatynowa, IC) jest częścią przedziału aktywnego. Do IC wnikają aktywne transkrypcyjnie pętle chromatynowe, ale z definicji IC to obszar „niechromatynowy”. Stąd stwierdzenie, że IC „charakteryzuje się małą gęstością nukleosomów”, jest zbytnim skrótem myślowym, podobnie jak: „Charakterystyczne dla interchromatyny jest znaczne wzbogacenie w potranslacyjną modyfikację H3K4me3” (oba cytaty ze str. 21). Forma histonu H3K4me3 jest charakterystyczna dla chromatyny aktywnej transkrypcyjnie i wykrywana w chromatynie graniczącej z IC, a nie w samym przedziale IC (zob. np.: *Smeets, D. i in. (2014), Epigenetics & Chromatin 7, 8, <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-8>*).
2. Białko kodowane przez gen *NPML* funkcjonuje w literaturze pod różnymi nazwami, jednak zgodnie np. z danymi baz UniProt i NCBI/Protein jego oficjalną nazwą jest ang. *nucleophosmin*. Dla zachowania spójności ze źródłami anglojęzycznymi warto byłoby rozważyć stosowanie nazwy „nukleofosmina”, która już pojawia się w polskiej literaturze naukowej.
3. W opisie białka B23 (nukleofosminy) pojawia się stwierdzenie: „Posiada ono, tak jak i inne białka jąderkowe sygnał lokalizacji jąderkowej NoLS” (str. 26). Sekwencje różnych białek niezbędne do lokalizacji w jąderkach i nazywane NoLS charakteryzują się dużym zróżnicowaniem, chociaż zdecydowanie dominują w nich aminokwasy zasadowe (R/K).

Wyznacznikiem potencjału zatrzymania białka w jąderkach jest więc raczej obecność silnego ładunku dodatniego skumulowanego na określonej powierzchni białka, a nie konkretnej sekwencji aminokwasowej. Z drugiej strony, typowe sekwencje NoLS są stosunkowo rzadkie i nie są bezwzględnie wymagane do lokalizacji jąderkowej. Akumulacja białek w jąderkach najczęściej jest konsekwencją wiązania do innych składników jąderka: DNA/RNA lub białek (Martin RM i in. (2015) *Nucleus*. 6:314-25, <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1079680>; Emmott E i Hiscox JA. (2009) *EMBO Rep*. 10:231-8, <https://doi.org/10.1038/embor.2009.14>).

4. Stwierdzenie: „*Aktywacja klasycznego szlaku reakcji na stres jąderkowy powoduje uwolnienie białek rybosomalnych z jąderka do nukleoplazmy a następnie dochodzi do utraty integralności jąderka*” jest uproszczeniem, gdyż różne czynniki stresowe wpływają w różny sposób na jąderka, w tym na kolejność przemieszczania się białek do nukleoplazmy. Na zachowanie integralności jąderek większy wpływ ma przemieszczanie innych białek niż rybosomalne. W zależności od nasilenia i czasu ekspozycji na czynnik stresowy nie zawsze dochodzi też do dezintegracji jąderek, czasami jedynie do ich reorganizacji.
5. Skrót myślowy wkraść się chyba też do zdania: „*indukowana przez środowisko lub traumatyczne przeżycia metylacja DNA zmienia właściwości kodowanego przez gen białka*” (str. 28). Chodziło zapewne o zmianę zawartości komórkowej białka będącą konsekwencją zmian w ekspresji genu.
6. Białko DNMT3L, wymienione na str. 29 jako jedna z metylotransferaz DNA (DNMT), nie wykazuje tej aktywności enzymatycznej, chociaż ze względu na homologię sekwencji jest zaliczane do rodziny DNMT. Może natomiast pełnić rolę regulacyjną w metylacji DNA oddziałując z metylotransferazami DNMT3A i DNMT3B.
7. Białko MDM2 powinno być precyzyjnie określone jako „*ligaza ubikwityny*”, a nie „*ligaza*”

Następujący po Wstępie krótki rozdział **Założenia i cele pracy** prezentuje hipotezę i szczegółowe cele badawcze, które mgr Holm-Kaczmarek potem konsekwentnie realizowała. Cele były też adekwatnie aktualizowane w trakcie wykonywania pracy, o czym świadczy rozszerzenie ich o analizę morfologii struktur jąderkowych zawierających ATRX, które Doktorantka odkryła dopiero realizując projekt. Należy podkreślić, że hipoteza została odpowiednio umotywowana wiedzą przedstawioną we Wstępie i dodatkowo opiera się na własnych wcześniejszych badaniach zespołu (zob. wyżej).

Część metodyczna pracy została podzielona na dwa rozdziały. W pierwszym z nich Autorka opisała bardzo skrupulatnie, włącznie z podaniem numerów katalogowych, odczynniki i inne materiały wykorzystywane w badaniach. Ich pogrupowanie w przejrzyste tabele bardzo ułatwia znalezienie potrzebnych informacji. W kolejnym rozdziale omówione zostały szczegółowo stosowane metody. Opis jest na tyle dokładny, że umożliwia niezależne powtórzenie doświadczeń.

Zabrakło jedynie informacji na temat hodowli mysich neuronów hipokampalnych i linii nerwiaka zarodkowego, które są pokazane w podrozdziale 5.6.3 rozdziału Wyniki. Nie udało mi się też znaleźć informacji, jakie było ostateczne stężenie procentowe DMSO w podłożu hodowlanym. Zbyt wysokie stężenie DMSO może wpływać na funkcjonowanie komórek, a w pracy nie zostały pokazane porównania obrazów mikroskopowych komórek hodowanych w podłożu standardowym i z dodatkiem DMSO. Czy sam DMSO nie wpływa na lokalizację analizowanych białek i strukturę chromatyny?

Wyniki zostały zaprezentowane w logicznym ciągu na czytelnych i dobrze opisanych rycinach. Doktorantka prowadziła większość badań z wykorzystaniem pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych poddanych procedurze chemicznego długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (cLTP). Wykazała, że ATRX w stymulowanych neuronach współwystępuje ze skondensowaną nieaktywną transkrypcyjnie chromatyną, ale częściowo lokalizuje się także w obszarach euchromatynowych. Obniżenie komórkowej zawartości ATRX skutkuje podwyższoną kondensacją chromatyny oraz zaburzeniem morfologii drzewek dendrytycznych. Ponadto mgr Holm-Kaczmarek jako pierwsza zaobserwowała w niektórych neuronach zagęszczanie ATRX w wyraźnie wyodrębnionych sferycznych strukturach nazwanych w pracy ciałkami ATRX. Liczba struktur jąderkowych zawierających ATRX wzrasta w warunkach pobudzenia cLTP oraz stresu jąderkowego, co sugeruje, że ATRX może pełnić dodatkowo niepoznane jeszcze funkcje w tych dwóch procesach.

Większość badań opisanych w rozprawie opierała się na mikroskopowych analizach komórek, w których wybrane białka znakowano immunofluorescencyjnie. Na pierwszej rycinie (Ryc. 5.1) Autorka pokazała obraz mikroskopowy szerszego pola widzenia obejmującego kilka jąder komórkowych. Pozostałe zdjęcia ilustrujące analizy szurzych neuronów hipokampalnych przedstawiają pojedyncze przykładowe jądra. Jednak na wspomnianej Ryc. 5.1. widać, że jądra różnią się między sobą zarówno rozmieszczeniem ATRX, jak i stopniem kondensacji DNA. Podobnie, kiedy porówna się obraz jąder komórek stymulowanych cLTP pokazanych na różnych rycinach (Ryc.5.2, 5.6 – 5.10 i kolejne) widać znaczne różnice w rozmieszczeniu ATRX (np. por. 2h cLTP na Ryc.5.2 i 5.9). Warto byłoby podać informację, jaki procent jąder wykazywał rozmieszczenie analizowanych białek i DNA takie jak pokazane na przykładowych zdjęciach. Odpowiednią informację znalazłam w Dyskusji tylko w odniesieniu do jąder zawierających jąderkowe ciała ATRX (ok. 20% komórek). Inne pytanie, które mi się nasunęło, to czy utrwalanie komórek w trakcie procedury znakowania immunofluorescencyjnego nie zmienia rozmieszczenia wewnątrzjąderkowego ATRX. Czy porównywano je np. z lokalizacją białka fuzyjnego typu ATRX-GFP w komórkach obserwowanych przyżyciowo?

Współwystępowanie (kolokalizacja) białek oraz białek i DNA było weryfikowane z wykorzystaniem dwóch niezależnych dodatków do programu ImageJ: i) wykreślającego profil RGB wybranego przekroju jądra i ii) mapę kolorów kolokalizacji (*Colocalization colormap*). Prosiłabym o doprecyzowanie w czasie obrony, jak Doktorantka interpretowała indeks korelacji (Icorr) wyliczany w drugiej z wymienionych analiz. Nie jest dla mnie jasne, jak wartości Icorr przekładały się na wnioskowanie o kolokalizacji cząsteczek lub jej braku.

Szczególnie zainteresowały mnie ciała ATRX. Czy sama obserwacja lokalizacji ATRX i DAXX w postaci granul jest wystarczająca, żeby mówić o nowych substrukturach jąderkowych? Byłabym też ostrożna w twierdzeniu, że ATRX jest niezbędne dla utworzenia tych struktur (np. str. 98) jedynie na podstawie obserwacji, że jest wymagane do zatrzymania w nich białka DAXX. Chętnie wysłuchałabym w czasie obrony opinii Doktorantki na ten temat oraz jakie ma propozycje dalszych badań, które mogłyby zidentyfikować naturę i rolę postulowanych ciałek ATRX. Wygląd pokazywanych ciałek kojarzy mi się np. z jąderkową lokalizacją białek typowych dla małych ciał jąderkowych: koiliny (ang. *coilin*, z ciałek Cajala) i białka PML, wykrywanych w pewnych warunkach także w jąderkach w formie zbliżonych sferycznych struktur (zob. *Gilder AS i in. (2011) Mol Biol Cell. 22:1070-9. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0731>; Tapia O i in. (2010). *Chromosoma. 119:527-40. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0276-7>; Mattsson K i in. (2001) *Proc Natl Acad Sci. 98:1012-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1012>*). Natomiast struktury, w których gromadzi się ATRX po zahamowaniu aktywności polimerazy I RNA, bardzo przypominają tworzone przez fibrylarynę lub przez UBF w analogicznych warunkach i warto byłoby zweryfikować, czy nie są z nimi tożsame (zob.: Shav-Tal Y i in. (2005) *Mol Biol Cell. 6:2395-413. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0992>*).**

Poniżej zamieszczam kilka dodatkowych drobnych uwag do rycin prezentujących wyniki:

1. Ryc. 5.1 – w górnym rzędzie panelu przedstawiającego pojedyncze jądra zdjęcia są podpisane odwrotnie, tzn. podpisane ATRX to barwienie DNA, a DNA – znakowanie ATRX.
2. Ryc. 5.4 – bardziej odpowiedni byłby opis typu: „zawartość białka cFos”, niż „ekspresja białka cFos”.
3. Ryc. 5.8 – profil RGB pokazuje moim zdaniem brak kolokalizacji ATRX i modyfikowanego histonu H3K9Ac w warunkach kontrolnych, a oba białka zaczynają się kolokalizować dopiero po pobudzeniu cLTP. Opis ryciny sugeruje, że analizowane białka kolokalizują się niezależnie od warunków.
4. Ryc. 5.23, str. 84 – opis ryciny sugeruje, że objętość aktywnej chromatyny spada po wyciszeniu ATRX, niezależnie od warunków doświadczalnych. Jednak z wykresu wynika, że ten spadek ma miejsce po pobudzeniu cLTP, ale nie w warunkach kontrolnych.

Pracę zamyka **Dyskusja** i krótki rozdział **Podsumowanie i wnioski**. O ile Wstęp był dosyć ogólny, to Autorka rekompensuje to w Dyskusji i szczegółowo omawia rolę ATRX w neuronach, sięgając do najnowszych artykułów naukowych, w tym opublikowanych w ciągu ostatniego roku. Na tym tle omówione zostają wyniki zaprezentowane w pracy. Dyskusja jest poprawna, odnosi się do wszystkich uzyskanych wyników. Zabrakło mi jedynie trochę bardziej pogłębionego przedyskutowania potencjalnej wielofunkcyjności ATRX w czasie pobudzenia neuronalnego. Jak Doktorantka interpretuje możliwe jednoczesne zaangażowanie ATRX w rejonach chromatyny aktywnych i nieaktywnych transkrypcyjnie?

Podsumowując, wyniki uzyskane przez mgr Holm-Kaczmarek potwierdziły rolę ATRX w organizacji chromatyny w jądrach neuronów w stanie spoczynku oraz w rearanżacji struktury chromatyny w stanie pobudzenia cLTP. Tym samym Doktorantka potwierdziła postawioną na wstępie hipotezę. Przeprowadzone badania były dobrze zaplanowane, uwzględniały odpowiednie kontrole, a tam, gdzie to było uzasadnione, także analizę ilościową i statystyczną. Wyniki zostały przedyskutowane w kontekście aktualnej wiedzy i dostępnych danych literaturowych. Uwagi zamieszczone wyżej wynikają z chęci naukowej dyskusji, a nie mają na celu umniejszenia wartości pracy Doktorantki.

Uwagi dotyczące bibliografii

Spis piśmiennictwa obejmuje około 120 pozycji, ale niestety jest niekompletny. Naliczyłam dodatkowo około 50 prac cytowanych w tekście i niewymienionych w Bibliografii. Braki są na tyle duże, że nasuwa się przypuszczenie, iż do pracy został omyłkowo dołączony nieostateczny, roboczy spis zamiast właściwego. Sugeruję okazanie uzupełnionej Bibliografii (w formie wydruku) w czasie obrony i załączenie jej do dokumentacji obrony oraz jako erratę do rozprawy. Udało mi się zidentyfikować niemal wszystkie pozycje brakujące w spisie. Przeważająca większość z nich to oryginalne prace doświadczalne lub przeglądowe opublikowane w periodykach naukowych i nie budzą merytorycznych zastrzeżeń. Jeśli dobrze zidentyfikowałam źródła niewymienione w Bibliografii, to w kilku miejscach, omawiając podstawy funkcjonowania układu nerwowego i komórek nerwowych, Autorka cytuje podręczniki akademickie (np. Konturek, 1998 to prawdopodobnie podręcznik pt. „Fizjologia człowieka tom IV – Neurofizjologia”, a Longstaff, 2011 – „Krótkie wykłady. Neurobiologia”). Są to źródła wiarygodne, ale w rozprawie doktorskiej byłoby lepiej wykorzystać aktualne artykuły naukowe. Szkoda też, że we Wstępie Autorka nie odwołuje się częściej do prac badawczych, a jedynie do publikacji przeglądowych, czasami dosyć starych. Należy jednak zaznaczyć, że w Dyskusji zacytowanych zostało znacznie więcej prac oryginalnych i opublikowanych w ostatnim czasie, co pokazuje, że mgr Holm-Kaczmarek ma odpowiednią orientację w literaturze związanej z tematyką jej pracy i aktualną wiedzę na ten temat.

Niektóre z prac cytowanych we Wstępie są poza tym nie do końca trafnie dobrane. Przykładowo: i) praca Kobayashi, 2008 podana jako odnośnik do informacji, że „*Jąderko, oprócz rDNA zlokalizowanego w obszarach NOR, składa się głównie z białek*” (str. 25), nie omawia składu białkowego jąderka, a traktuje głównie o roli rRNA; ii) przy opisie modyfikacji histonów (str. 29) pojawia się odwołanie do pracy Rorbach-Dolata i in., 2017, która omawia zmiany epigenetyczne związane z rozwojem cukrzycy i zawiera tylko krótki podrozdział na temat ogólnie modyfikacji histonów. Miejscami we Wstępie brakuje też odnośników do źródeł literaturowych, np. przy omawianiu: charakterystyki jąderka (str. 23), nukleoliny (str. 25), rozwoju koncepcji epigenetyki (str. 28), wpływu modyfikacji histonów na transkrypcję (Tabela 1.1, str. 30/31), kompleksów przebudowujących chromatynę (str. 32). O ile w większości przypadków pominięcie cytowania dotyczy podstawowej i łatwej do zweryfikowania wiedzy, to w kontekście badań prowadzonych przez Doktorantkę szczególnie brakowało mi podania źródła informacji: „*Neurony pierwotnej hodowli in vitro wykształcają dendryty i aksony oraz charakteryzują się ekspresją tych samych białek znacznikowych, co komórki nerwowe in vivo*” (str. 15).

Uwagi dodatkowe

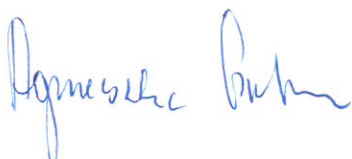
Doktorantka napisała pracę w większości prawidłowym i jasnym językiem, co sprawia, że tekst dobrze się czyta i łatwo podąża się za tokiem przekazu. W pracy zdarzają się jednak niepoprawnie skonstruowane zdania, w tym takie, których błędy konstrukcyjne wypaczają ich sens (np. „*jest ważnym białkiem utrzymującym strukturę chromatyny o właściwościach helikazy*”, str. 5; „*W odróżnieniu od dendrytów neurony posiadają tylko jeden akson*”, str. 13). DNA i RNA występują w rodzaju nijakim. Ostatnio coraz więcej słowników dopuszcza użycie tych skrótowców jako wyrazów w rodzaju nijakim, ale jednak nadal rodzaj męski jest podawany jako podstawowy i w oficjalnych tekstach pisanych powinien być zachowany. Autorce udało się w większości przypadków uniknąć żargonu laboratoryjnego (trochę daje się zauważyć w opisie metod), ale miejscami wkradły się anglicyzmy lub niezbyt fortunnie spolszczone terminy (np. linkerowy DNA, str. 20; foci, str. 80; wysegmentowane jądra, str. 82). Zauważyłam też sporo błędów interpunkcyjnych (głównie brak przecinków, czasami kropek na końcu zdania) oraz typowo redakcyjno-edytorskich, w tym literówki i brak spacji (często przed jednostkami miar). W wykazie skrótów zabrakło konsekwencji redakcyjnej, większość skrótów pochodzących od terminów anglojęzycznych jest rozwinięta w dwóch językach, ale niektóre tylko po polsku, a ponadto część pełnych nazw została zapisana wielką, a część - małą literą. Należałoby też zwrócić większą uwagę na zapis nazw genów i białek, zwłaszcza funkcjonujących jako skrótowce oraz stosowanie tych nazw konsekwentnie w jednej formie (np. pojawia się cFos i cFOS).

Zdecydowanie jednak najpoważniejsze niedociągnięcie, o którym pisałam wcześniej, to niekompletna bibliografia, która dodatkowo zawiera błędy redakcyjne, w tym niepełne dane bibliograficzne (np. prac: Gibbons i Higgs, 2000; Cremer, 2015, Goldberg i in., 2011, Higgs i in., 2005, i innych) oraz nieujednolicone formatowanie cytowania. Inne błędy redakcyjne, które znalazłam w Bibliografii, to niepotrzebne zamieszczenie adresu internetowego pracy Biała, 2007, omyłkowe podanie lokalizacji pliku na lokalnym dysku komputerowym (pracy: Sacharowski, 2019) oraz pozostawienie w kilku miejscach niepotrzebnych znaków, wyrazów, liczb porządkowych i imion autorów. W danych pracy Gapp i in., 2014 został ponadto błędnie podany tytuł. Oczywistość tych błędów tym bardziej sugeruje, że do rozprawy został mylnie dołączony roboczy, a nie ostateczny, spis literatury.

Chciałabym podkreślić, że wyszczególnione wyżej niedociągnięcia dotyczą głównie strony redakcyjnej pisania rozprawy i jakkolwiek mogą mieć wpływ na jej odbiór, to nie wpływają na ocenę merytorycznej strony pracy. Uwagi zawarte w tej części recenzji nie wymagają ustosunkowania się Doktorantki w czasie obrony.

Wniosek końcowy

Podsumowując, po zapoznaniu się z zaprezentowaną rozprawą oceniam, że mgr Dagmara Holm-Kaczmarek przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jednocześnie wykazując się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych i posiada adekwatną wiedzę teoretyczną z dziedziny, w której wykonywała swoją pracę doktorską. W mojej opinii mgr Dagmara Holm-Kaczmarek wypełniła ustawowe wymagania stawiane osobom ubiegającym się o stopień doktora. **Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, z późn. zm.).** W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Dagmary Holm-Kaczmarek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.





UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dnia 22.04.2024 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 Dągmary Holm-Kaczmarek pt. „Rola białka ATRX w organizacji chromatyny neuronów hipokampa mózgu szczura.”

Rozprawa doktorska została opracowana pod kierunkiem dr hab. Adriany Magalskiej oraz prof. dr hab. Marii Jolanty Rędownicz w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej oraz Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Jako recenzent, zostałem powołany do oceny tej pracy przez Radę Naukową Instytutu.

Przedmiotem doktoratu jest rola białka ATRX w funkcjonowaniu neuronów hipokampa, kluczowego dla utrzymania struktury chromatyny i związanego z zespołem ATRX, który objawia się, między innymi, opóźnieniem umysłowym. Autorka rozprawy za cel postawiła sobie zbadanie lokalizacji i funkcji ATRX w jądrze komórkowym neuronów w stanie spoczynku oraz po indukowanym długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym. Badania przeprowadzone na hodowlach pierwotnych neuronów hipokampalnych dostarczyły interesujących informacji o wpływie białka ATRX na organizację chromatyny i morfologię drzewek dendrytycznych.

Białko ATRX jest niezbędne w regulacji struktury chromatyny i procesach transkrypcji, rozpoznaje i przekształca heterochromatynę, współpracując z modyfikowanymi histonami oraz białkami HP1 α i HP1 β , które stabilizują heterochromatynę. Współdziała również z EZH2 i MeCP2 w kontekście metylacji histonów i wyciszania genów. Istotna jest także jego współpraca z DAXX, która umożliwia relokację histonu H3.3, kluczowego dla transkrypcji, replikacji DNA i naprawy uszkodzeń. Rola ATRX w neuronach jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania tych komórek, a jej dalsze badania mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych.

Wstęp do pracy doktorskiej stanowi dobry opis struktury i funkcji neuronów oraz mechanizmów plastyczności neuronalnej z szczegółowym omówieniem roli jądra komórkowego i jąderka. Autorka omawia plastyczność neuronalną, akcentując jej rolę w adaptacji mózgu do nowych doświadczeń, uczenia się i pamięci. Następnie skupia się na strukturze i funkcjach jądra komórkowego, centrum regulacji ekspresji genów. Dalej we wstępie pracy opisuje funkcje jąderka, omawiając wybrane białka jąderkowe, wpływ stresu na funkcjonowanie jąderka i specyfikę jąderka w komórkach nerwowych. Porusza też procesy kontrolujące strukturę chromatyny, takie jak modyfikacje DNA i histonów, oraz kompleksy przebudowujące chromatynę, niezbędne dla odpowiedniej ekspresji genetycznej. W końcu wstępu koncentruje się na białku ATRX, jego strukturze, funkcjach i związku z zespołem ATRX, co stanowi wprowadzenie do głównego tematu pracy. Szczegółowy opis funkcji helikazy ATRX, jej roli w utrzymaniu struktury chromatyny oraz interakcjach z innymi białkami ukazuje kompleksowość i znaczenie tego białka szczególnie w badanych komórkach.

W doktoracie autorka wysunęła hipotezę, że białko ATRX uczestniczy w reorganizacji chromatyny po stymulacji synaptycznej. Do weryfikacji tej hipotezy przeprowadziła analizę lokalizacji białka ATRX w jądrach neuronów hipokampalnych zarówno w stanie spoczynkowym, jak i po indukowanym pobudzeniu, prowadzącym do długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP). Badania obejmowały także ocenę współwystępowania białka ATRX z modyfikacjami potranslacyjnymi histonów, sprawdzenie wpływu obniżenia poziomu ATRX na organizację chromatyny, analizę morfologii struktur jąderkowych zawierających ATRX oraz ocenę morfologii neuronów z obniżonym poziomem tego białka.

Najistotniejsze wnioski wynikające z analizy wyników pracy to:

- A.** Białko ATRX zmienia swoją lokalizację w jądrze neuronów hipokampalnych w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne, takie jak chemicznie indukowana długotrwała potencjalizacja (cLTP). W stanie spoczynkowym ATRX współwystępuje z heterochromatyną, natomiast po pobudzeniu kolokalizuje się również z euchromatyną, co świadczy o jego dynamicznej roli w przestrzennych zmianach chromatyny.
- B.** Obniżenie poziomu białka ATRX prowadzi do nadmiernej kondensacji chromatyny, manifestującej się tworzeniem licznych skupień heterochromatyny. Potwierdza to kluczową rolę ATRX w utrzymaniu prawidłowej organizacji chromatyny w jądrach neuronów.
- C.** Redukcja poziomu ATRX powoduje istotne zaburzenia w rozwoju drzewka dendrytycznego neuronów, wskazując na zaangażowanie tego białka w regulację tych procesów.
- D.** Odkryto nowe struktury jąderkowe, nazwane ciałkami ATRX, które zawierają białko ATRX w kompleksie z białkiem DAXX. Obecność ATRX jest niezbędna do formowania tych ciałek, a ich liczba i położenie w jąderku zmieniają się w zależności od pobudzenia synaptycznego (cLTP) oraz warunków stresu jąderkowego, sugerując potencjalny udział w odpowiedzi na te czynniki.
- E.** Wyniki wskazują na wielofunkcyjną rolę białka ATRX w regulacji chromatyny w neuronach. ATRX uczestniczy zarówno w utrzymaniu stanu spoczynkowego chromatyny, jak i w jej dynamicznej przebudowie w odpowiedzi na sygnały synaptyczne, kolokalizując się z heterochromatyną i euchromatyną.

Podsumowując, praca dostarcza nowych, istotnych informacji o funkcjonowaniu białka ATRX w neuronach, pogłębiając wiedzę na temat jego roli w przestrzennej organizacji chromatyny, rozwoju drzewek dendrytycznych oraz odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne i stres jąderkowy.

Badania zaprezentowane w tej rozprawie stanowią doskonały przykład eksperymentalnej biologii komórkowej. Godne podziwu jest precyzyjne zaplanowanie oraz logika przeprowadzonych eksperymentów, które przyniosły bardzo interesujące wyniki.

Te wyniki umożliwiają postawienie ciekawych pytań, na które Autorka odpowiada w rozdziale "Dyskusja", formułując nowe hipotezy dotyczące odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne oraz stres jąderkowy.

Uwagi:

Większość wyników badań uzyskano przy użyciu techniki mikroskopii fluorescencyjnej, a następnie analizowano je, wykorzystując różne metody analizy kolokalizacji. Moim zdaniem, doskonałym wyborem do tego typu analiz byłaby mikroskopia wysokorozdzielcza typu STORM lub technologia Minflux. Inną możliwością byłoby zastosowanie metody ligacji zbliżeniowej *in situ* (PLA) na co Autorka zwróciła uwagę w dyskusji. Oczywiście, te techniki są bardzo kosztochłonne lub wymagają specjalistycznego sprzętu, co stanowi poważne ograniczenie dla badacza. Z tego względu, wybór metody analizy kolokalizacji z użyciem detekcji fluorescencji uzyskanej w mikroskopie konfokalnym, wydaje się być trafny, mimo wszystkich związanych z tym ograniczeń.

Główne pytanie, które chciałbym zadać, dotyczy wyboru metody analizy kolokalizacji. Dlaczego autorka zdecydowała się na analizę za pomocą metody "Colocalization Colormap", a nie na przykład analizę opierającą się na takich współczynnikach kolokalizacji jak współczynnik Mandersa, korelacja Spearmana czy korelacja Pearsona.

Metoda "Colocalization Colormap" jest prostym i łatwym w obsłudze narzędziem do wizualizacji kolokalizacji, które generuje mapę kolorów przedstawiającą intensywność każdego kanału oraz pikseli kolokalizowanych. Umożliwia to szybką ocenę stopnia kolokalizacji między dwoma kanałami. Ta technika jest przydatna, jednak posiada ograniczenia, ponieważ nie dostarcza ilościowych współczynników kolokalizacji i nie nadaje się do szczegółowej analizy.

Moim zdaniem, lepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie innej metody, na przykład "Just Another Colocalization Plugin" (JACoP) dostępnego w programie ImageJ. JACoP oferuje bardziej zaawansowane narzędzia do ilościowej analizy kolokalizacji, takie jak współczynniki Mandersa, korelacja Spearmana i korelacja Pearsona. Te metody umożliwiają lepszą analizę i łatwiejszą interpretację kolokalizacji na poziomie molekularnym, co czyni je bardziej odpowiednim narzędziem dla badań wymagających szczegółowych wyników do dalszej analizy.

W pracy występują drobne błędy językowe czy edytorskie w tekście, które są nie do uniknięcia przy tak obszernym tekście i nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę pracy.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani magister Dagmary Holm-Kaczmarek 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. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani magister Dagmary Holm-Kaczmarek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK