

Poznań, dnia 30.08.2024r.

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

dr hab. Zuzanna Bukowy-Bieryłło
Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej
IGC PAN w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Białka rzęskowe potencjalnego szlaku kinaz MAP powiązane z aparatem centralnym rzęski ruchomej *Tetrahymena*”

Dla: Rada Naukowa Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Doktorant: mgr inż. Justyna Sekretarska

Zaprezentowana do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Sekretarskiej została wykonana w Pracowni Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod opieką dr hab. Ewy Joachimiak. Rozprawa dotyczy stosunkowo słabo poznanego zagadnienia, jakim jest struktura aparatu centralnego rzęski ruchomej oraz związanych z nim kinaz MAP. Jest to logiczna kontynuacja poprzednich badań Zespołu opublikowanych w 2021 przez Promotorkę Doktorantki (Joachimiak i in, 2021).

Rzęska to zakonserwowana organella komórkowa obecna w większości komórek eukariotycznych; składa się z wystającej poza obręb komórki aksonemy oraz zakotwiczonego w błonie komórkowej ciała podstawnego. Dwa podstawowe typy rzęsek to nieruchome rzęski czuciowe (zwane także pierwotnymi) oraz rzęski ruchome, pełniące głównie rolę transportową. Upośledzenie ruchu lub brak rzęsek ruchomych powoduje pierwotną dyskinezę rzęsek (PCD, z ang. Primary Ciliary Dyskinesia). Do objawów PCD należą nawracające infekcje dróg oddechowych, niepłodność męska, u części pacjentów występuje także odwrócenie trzewi (situs inversus). Do tej pory zidentyfikowano ok. 50 genów, których mutacje powodują PCD, jednak mutacje te są w stanie zidentyfikować przyczynę PCD jedynie u ok. 75% pacjentów. To oznacza, że należy ciągle poszukiwać nowych genów, które mogą być odpowiedzialne za tą chorobę.

Struktura aksonemy rzęski ruchomej składa się z 9 dubletów mikrotubul położonych obwodowo, a w części środkowej rzęski znajduje się aparat centralny, złożony z dwóch mikrotubul oraz białek tworzących tzw. wyrostki. Aparat centralny jest połączony z dubletami mikrotubul obwodowych przez kompleksy szprych promienistych. Dane literaturowe sugerują, że aparat centralny jest odpowiedzialny za inicjację ruchu rzęski, sygnał ten następnie jest przekazywany dalej

przez kompleksy szprych promienistych do obwodowych dubletów mikrotubul zawierających makrokompleksy odpowiedzialne za generowanie ruchu. Jednakże, szczegóły dotyczące struktury aparatu centralnego oraz mechanizmu inicjacji czy przekazywania sygnału są tylko częściowo poznane. Dlatego też temat ten jest istotny, nie tylko ze względu na samo zrozumienie mechanizmów regulacji ruchu rzęski, ale może wnieść nowe informacje na temat sygnalizacji wewnątrzrzęskowej, czy genów aparatu centralnego potencjalnie zaangażowanych w PCD.

Opis formalny:

Rozprawa została przygotowana w formie manuskryptu, w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej. Rozprawa zawiera podziękowania, opis finansowania, spis treści, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję z podsumowaniem oraz wnioski. W rozprawie znajdują się także 8 tabel oraz 46 rycin. Rozprawę kończy spis literatury obejmujący ponad starannie dobranych 160 pozycji.

Wstęp obejmuje klarowne wprowadzenie do tematu rzęsek z syntetycznym opisem budowy kompleksów wchodzących w skład rzęsek, roli aparatu centralnego oraz podsumowaniem aktualnej wiedzy na temat roli kinaz MAP w komórce i rzęsce ruchomej. W ostatnim podrozdziale wstępu opisano organizm modelowy, orzęsek *Tetrahymena thermophila*, na którym przeprowadzono wszystkie doświadczenia wchodzące w skład rozprawy.

Doktorantka uważnie wybiera zagadnienia nad którymi się skupia, swobodnie poruszając się w literaturze starszej i nowszej, dzięki czemu rozdział ten jest zawiera wszystkie niezbędne informacje, ale jednocześnie jest zwięzły, klarowny i bez zbędnych szczegółów - jedynie 18 stron. Wstęp doskonale prezentuje wiedzę teoretyczną Doktorantki na temat rzęsek i ich struktury oraz znajomość literatury przedmiotu.

Cele pracy. Niedawne badania Promotor Doktorantki (Joachimak i in. 2021), zidentyfikowały szereg białek, których poziom ulega zmianie (podwyższeniu lub obniżeniu) po delecji białek Spf2A lub Cfp69, wchodzących w skład wypustki C1b aparatu centralnego. Niektóre ze zmienionych białek to białka enzymatyczne, należące do szlaku kinaz MAP, które potencjalnie mogą brać udział w regulacji aktywności białek budujących wypustkę C1b aparatu centralnego, a także w generacji i regulacji sygnałów przekazywanych z aparatu centralnego do promieni łączących. Dlatego też w oparciu o poprzednie badania Zespołu, Doktorantka jako cel pracy wybrała określenie, czy białka Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz budująca wyrostek C2c kinezyna Kif9 mogą stanowić elementy i regulatory wspólnego szlaku regulatorowego kinaz MAP w aparacie centralnym rzęski ruchomej orzęska *Tetrahymena*. Doktorantka wyróżniła 6 celów szczegółowych: 1) analiza bioinformatyczna badanych białek; 2) zbadanie ich lokalizacji w komórkach *Tetrahymena*; 3) identyfikację potencjalnych partnerów białka Dusp5 oraz 4) białek tworzących trwały kompleks z białkiem Dusp5; 5) identyfikacja wzajemnych oddziaływań bezpośrednich białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz Kif9, a także 6) zbadanie roli białek Dusp5 oraz Kif9 w komórkach *Tetrahymena* poprzez delecję genów i porównanie fenotypu mutantów do fenotypu komórek typu dzikiego.

Kolejne rozdziały rozprawy to **Materiały** (13 stron) oraz **Metody** (38 stron). Zawierają one opisy odczynników oraz licznych metod użytych w rozprawie, od klasycznych metod biologii

molekularnej i biochemicznej analizy białek, aż do specjalistycznych metod badań oddziaływań między białkami (bioID, co-IP, MS/MS, pull-down). Na uwagę zasługuje także ponad 35 mutantów *Tetrahymena* uzyskanych przez Doktorantkę (wymienione w Tabeli 4 w Metodach).

Rozdział **Wyniki** liczy 57 stron i jest najobszerniejszą częścią rozprawy. Jest on podzielony na 7 podrozdziałów, mniej więcej zgodnych z celami szczegółowymi pracy (realizacja celu 1 jest opisana w podrozdziałach 5.1. i 5.2).

Przeprowadzone przez Doktorantkę wnikliwe analizy filogenetyczne i domenowe badanych białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dups5, Pp2c i Kif9 wykazały, że większość z tych białek jest stosunkowo dobrze zachowana w toku ewolucji i posiada zachowaną funkcję enzymatyczną/ katalityczną. Jedynie białka Map2k7 oraz Dusp5 są prawdopodobnie nieaktywne enzymatycznie, ponieważ zakonserwowane motywy aminokwasowe niezbędne do działania enzymu (odpowiednio kinazy lub fosfatazy) są u nich zmienione.

Wykorzystując ligazę TurboID przyłączoną do białka Spef2a lub do białka Dusp5a, Doktorantka wykazała następnie, że Dusp5 jest prawdopodobnie elementem wypustki C1b kompleksu pary centralnej, natomiast ani Spef2a ani Dusp5 nie oddziaływały trwale z badanymi kinazami MAP (Map2k7, Nek6, Pp2c oraz Kif9).

Szczegółowe badania pull-down przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały m.in., że Dusp5 potrafi oddziaływać z kinazami Mapk3, Map2k7 oraz Nek6, ale nie z białkiem Pp2c-HA. Podobne badania przeprowadzone dla większości badanych białek pozwoliły Doktorantce na stworzenie modelu wzajemnych oddziaływań, w którym białko Dusp5a tworzy trwałe kompleksy z białkami wypustki C1b aparatu centralnego *Tetrahymena* tj. Spef2A, Cfp69, Androglobiną, Cfp246/Lrguk, Cfp174 i THERM_00205170. Zarówno białko Dusp5a jak i Kif9 oddziaływały ze wszystkimi badanymi kinazami, tj. Mapk3, Map2k7 oraz Nek6, natomiast białko Pp2c nie oddziaływało z żadnym z tych białek.

Analiza funkcji białek strukturalnych aparatu centralnego rzęski, Dusp5 oraz Kif9, poprzez badanie mutantów KO tych białek wykazały, że delecja zarówno Dusp5 jak i Kif9 obniża tempo ruchu komórek *Tetrahymena* oraz tempo regeneracji rzęsek po eksperymentalnym odrzuceniu. Nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie proliferacji, fagocytozy czy długości rzęsek.

Badania przedstawione w rozdziale zostały przeprowadzone zgodnie z regułami sztuki i przedstawione zgodnie z najlepszymi zasadami prezentacji wyników naukowych. Ewentualne odstępstwa od planowanych badań (np. brak możliwości przygotowania jakiegoś mutantu) są od razu wspomniane, wraz z możliwą przyczyną takiego stanu. Przedstawione w rozdziale ryciny są wyjątkowo czytelne, pomimo że często są złożone z kilkunastu paneli.

Dyskusja jest zwięzła i stanowi nie tylko podsumowanie wyników opisanych w rozprawie, ale także ich dyskusję w szerszym kontekście. Doktorantka w uporządkowany sposób przedstawia podsumowanie wyników uzyskanych dla poszczególnych białek, a następnie proponuje dla nich funkcję w oparciu o dane literaturowe uzyskane dla białek o podobnej strukturze. W dyskusji Doktorantka zawarła także propozycje dalszych badań, które można by przeprowadzić, aby potwierdzić hipotezy na temat funkcji białka. Bardzo dobrym zabiegiem ułatwiającym zapamiętanie najważniejszych wniosków jest umieszczenie na końcu Dyskusji podsumowania poczynionych obserwacji oraz podsumowania wniosków sformułowanych na ich podstawie.

Z obowiązku recenzenta należy wspomnieć o pewnych niedociągnięciach obecnych w pracy, takich jak błędy interpunkcyjne, literówki, brak pkt. 5.6 w spisie treści, czy błędne podpisanie mutantu NEK6-3HA-pNeo4 jako nadprodukującego białko Dusp5 (Tabela 4, str. 44). Mam także szereg uwag dotyczących tekstu:

1. **Wstęp**, rozdział 1.2, str. 19: *...Zarówno rzęski pierwotne jak i rzęski ruchome zbudowane są z 9 par mikrotubul rozmieszczonych obwodowo.(...)*. W literaturze mówi się raczej o dubletach mikrotubul obwodowych i o parze mikrotubul centralnych.
2. **Wstęp**, rozdział 1.2, str. 19: *...Kompleksy te rozmieszczone są wzdłuż każdej tubuli A cyklicznie tworząc tzw. jednostkę rzęskową o długości 96 nm (Nicastro i in. 2006). W pojedynczym powtórzeniu rzęskowym znajdują się 4 zewnętrzne ramiona dyneinowe, 7 różnych pod względem budowy i funkcji wewnętrznych ramion dyneinowych, trzy promienie łączące oraz kompleks N-DRC (...)*. Pierwsze zdanie powinno się uzupełnić o wyrażenie ‘powtórzenie rzęskowe’, bez tego trudno zrozumieć, że kolejne zdanie odnosi się do tej samej struktury.
3. **Metody**, rozdział 4.7.4., str. 67: Podczas pomiaru długości rzęsek liczono minimum 100 rzęsek. Czy były to rzęski pochodzące z 1 komórki *Tetrahymena* czy z wielu?
4. **Metody**, rozdział 4.10.1, str.74: Doktorantka opisała metodę znakowania immunocytochemicznego komórek *Tetrahymena* - który z 3 opisanych na stronie 41 roztworów utrwalających był używany?
5. **Podrozdział 5.1, analiza filogenetyczna białek**: Na jakiej podstawie wybrano organizmy do analizy bioinformatycznej programem SMART?
6. **Ryc. 21**: analiza czasu biotynylacji białek sąsiadujących ze Spef2A-HA-TurboID metodą Western Blot. 15 min i 30 min wyglądają bardzo podobnie. Na jakiej podstawie wybrano czas 30 minut a nie 15 minut?
7. **Ryc. 28**: Mapk3-HA-OEX nadprodukowane w komórkach *Tetrahymena* powinno mieć masę ok. 49 kDa, a na membranie WB prążek tego białka znajduje się poniżej 40kDa. Jak może to Pani wytłumaczyć?

Podsumowanie:

W końcowych uwagach, chciałabym podkreślić, że pomimo drobnych niedociągnięć, całość rozprawy doktorskiej mgr Justyny Sekretarskiej oceniam bardzo wysoko. Zarówno szeroki zakres stosowanych nowoczesnych technik, wysoki poziom ich realizacji oraz klarowność przedstawienia uzyskanych wyników, umiejętność wyciągania wniosków i argumentowania zaprezentowane w rozprawie nie pozostawiają wątpliwości, że Doktorantka posiada wiedzę teoretyczną w literaturze przedmiotu oraz dojrzałość naukową niezbędną do samodzielnej pracy naukowej. Jednocześnie posiada także umiejętności literackie, które sprawiły że trudne badania zostały przedstawione w sposób klarowny, zwięzły i uporządkowany, a także poprawny merytorycznie i językowo. Świadczy to o znakomitym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

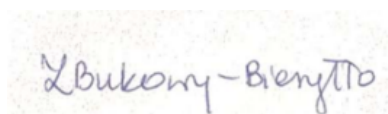
Recenzowana praca stanowi także oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Tematyka rozprawy jest unikalna, do tej pory nie opublikowano badań na ten temat. Ponadto, w rozprawie wykorzystano liczne, do tej pory nie przygotowane mutanty *Tetrahymena*, jak również zastosowano najnowsze metody badawcze zarówno wysokoprzepustowe jak i molekularne (BioID,

spektrometria mas, liczne analizy fenotypu mutantów).

Niniejszym potwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa 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 tym, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr. inż. Justyny Sekretarskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie ze względu na wyróżniający się poziom rozprawy, jakość badań w nich zawartych oraz ich potencjalny wpływ na dyscyplinę, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,





WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Marek Kulus

02-091 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 63 A

Warszawa 20.09.2024

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń

Dyrektor Instytutu

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego

Polska Akademia Nauk

Ul. Ludwika Pasteura 2

02-093 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. JUSTYNY SEKRETARSKIEJ P.T.

„BIAŁKA RZĘSKOWE POTENCJALNEGO SZLAKU KINAZ MAP POWIĄZANE Z APARATEM CENTRALNYM RZĘSKI RUCHOMEJ TETRAHYMENA.”

Osiągnięcia w dziedzinie badań nad rzęskami ruchomymi w czasie ostatnich kilku, kilkunastu lat, są konsekwencją niesamowitego postępu w naukach podstawowych związanego z zastosowaniem nowoczesnych narzędzi i nowych technik badawczych. Jako lekarz już blisko 40 lat zajmujący się między innymi chorymi z dyskinezą rzęsek odnoszę wrażenie, że dynamika tych osiągnięć w czasie ostatniej dekady była szczególnie duża. Nie zawsze tak było, bo chociaż choroby związane z zaburzeniami ich funkcji zaczęto opisywać już przed ponad 100 laty, to dopiero w latach 70-tych ubiegłego wieku, Bjorn Afzelius z zespołem wyjaśnili podstawy patogenetyczne pierwotnej dyskinezy rzęsek. Obserwacje kliniczne musiały zatem długo czekać na wyjaśnienie ich podłoża. Obecnie to nauki podstawowe stały się wyznacznikiem zmian i trendów postępu diagnostyki i terapii chorób związanych z rzęską ruchomą.

Rzęski ruchome, które są przedmiotem rozprawy, stanowią zazwyczaj mnogie struktury komórkowe i u człowieka występują na powierzchni komórek nabłonka pokrywającego drogi oddechowe, ucho środkowe, komory mózgu i jajowody. Oprócz funkcji motorycznej mogą również pełnić funkcje sensoryczne. Chociaż wiedza na temat ich budowy i funkcji jest już bardzo szeroka, to nadal pozostaje w niej wiele luk, które ulegają stopniowo wypełnieniu. Jedną

z nich w swojej pracy doktorskiej postanowiła wyjaśnić mgr inż. Justyna Sekretarska. Doktorantka zajęła się badaniem niescharakteryzowanych dotąd białek rzęskowych związanych z aparatem centralnym, które potencjalnie mogą brać udział w generacji ruchu rzęski. Jak dotąd nie opisano jeszcze białek biorących udział w regulacji szlaku MAP kinaz i ich roli w aparacie centralnym rzęsek ruchomych. Modelem badawczym na którym przeprowadzono badania była *Tetrahymena thermophila*.

W przedstawionej do recenzji monografii doktorantka przedstawiła szczegółowo założenia, cel pracy, metodologię badań, wyniki i wnioski z nich wynikające.

Rozprawa liczy 165 stron druku, z czego zasadniczy tekst pracy stanowi 129 stron. Pozostałą część zajmują spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis literatury i spis publikacji doktorantki. Układ pracy jest typowy dla tego rodzaju monografii.

We wstępie liczącym 19 stron doktorantka przedstawiła informacje na temat budowy rzęsek, roli aparatu centralnego oraz funkcji i występowania kinaz szlaku MAP w rzęskach. Jednym z podrozdziałów wstępu jest opis orzęska *Tetrahymena thermophila* tj. organizmu będącego modelem badawczym w prezentowanej pracy. Szczególnie ważne jest podkreślenie we wstępie niedostatku publikacji dotyczących kinaz MAP w rzęskach, co stanowi uzasadnienie do przedstawionego dalej celu pracy.

Cel pracy został przez doktorantkę poprzedzony dodatkowym wprowadzeniem. Wydaje mi się, że dużo trafniejsze uzasadnienie celu doktoratu zawarte jest w streszczeniu. Jest ono krótkie, syntetyczne i logicznie uzasadnia konieczność przeprowadzenia badań. Niemniej główny cel jest jasno przedstawiony. Doktorantka podjęła się określenia czy u *Tetrahymena* białka Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c i Kif9 mogą stanowić elementy i regulatory wspólnego szlaku regulatorowego kinaz MAP w aparacie centralnym rzęski ruchomej. Niewątpliwie jest to oryginalny pomysł badawczy i wcześniej w literaturze to zagadnienie nie było podejmowane.

Doktorantka przedstawiła ponadto sześć celów szczegółowych pracy, które wyznaczają kierunek podjętych działań. Trzy z nich zostało sformułowanych szerzej jak np.: „analiza bioinformatyczna białek(...)” czy „zbadanie lokalizacji badanych białek (...)” lub „zbadanie roli białek (...)” (punkty 1,2 i 6 – str.35), podczas gdy pozostałe mają nieco bardziej ograniczony i precyzyjny zakres. Pozwalają one na zrozumienie intencji autorki i tego co dokładnie będzie celem jej dociekań.

Materiały i metodykę badań doktorantka bardzo szczegółowo opisała na 40 stronach rozprawy. Wyjątkowo dokładnie opisane są materiały (może zbyt dokładnie). Zastosowane metody są bardzo nowoczesne, a plan przeprowadzenia badań przemyślany i gwarantujący uzyskanie wiarygodnych wyników. Współpraca z innymi zespołami badawczymi również sprzyjała, przy zaprezentowanej złożoności podjętych badań, zwiększeniu wartości osiągniętych rezultatów. Ta część pracy wskazuje na znakomite opanowanie warsztatu badawczego przez doktorantkę i jednocześnie pokazuje jak zaawansowanymi technikami badań dysponowała, aby móc sięgać po zaplanowane cele. To już przede wszystkim zasługa znakomitego ośrodka, w którym doktorantka mogła prowadzić badania.

Wyniki pracy zaprezentowano w przejrzysty i czytelny sposób. Dla zwiększenia czytelności uzyskanych danych doktorantka jak najbardziej zasadnie podzieliła je na dwie części. W pierwszej, zdecydowanie obszerniejszej przedstawiła analizę filogenetyczną i domenową potencjalnych białek szlaku MAP kinaz rzęsek ruchomych oraz określenie ich wzajemnych oddziaływań, a w drugiej analizę funkcjonalną wybranych białek. Spośród białek niestrukturalnych, których poziom w ciliomach pozbawionych wypustki C1b był zmieniony, autorka wybrała białka mogące stanowić elementy szlaku MAP kinaz. Scharakteryzowała szczegółowo 6 białek (Mapk3, Map2k7, Nek6, Dups5, Pp2c i Kif9), potwierdzając następnie ich lokalizację w rzęskach Tetrahymena i zaproponowała model sieci ich wzajemnych oddziaływań, co należy odnotować jako niezwykle ważne, oryginalne osiągnięcie. W części drugiej autorka podjęła próbę analizy funkcjonalnej oddziaływań białek w tej sieci badając fenotypy komórek pozbawione każdego z osobna z wyżej wspomnianych białek. W tej części pracy doktorantce udało się zbadać z powodów technicznych jedynie dwa z nich. Jako recenzent uznaję w pełni za zrozumiałe trudności w uzyskaniu komórek knock-out pozbawionych niektórych białek, ale stwierdzenie „z przyczyn technicznych” uważam za zbyt enigmatyczne. Moim zdaniem warto byłoby temu poświęcić kilka zdań komentarza. Tym bardziej, że zastosowane metody i uzyskane wyniki z są niezwykle interesujące. Ponadto w tym rozdziale wkradło się kilka błędów edytorskich. Od strony 104 do 120, numery rycin do których autorka odwołuje się w tekście są mniejsze o 1 od prawidłowych, a numer ryciny 33 zdublowany. Pomimo tego, prezentacja wyników jest bardzo czytelna, a niezwykle staranne ryciny ułatwiają odbiór i ich zrozumienie. Bardzo wartościowe jest dla mnie również zawarcie po każdej części wyników ich syntetycznego podsumowania.

W krótkiej, 9-stronicowej dyskusji doktorantka rzeczowo odnosi się do uzyskanych wyników, interpretując uzyskane zależności i przedstawiając uzasadnienie dla tez, które pragnęła

wyjaśnić podejmując się przeprowadzenia badań. Posługuje się przy tym piśmiennictwem liczącym 162 pozycje, z których 24 opublikowano w czasie ostatnich 5 lat. Dyskusja wraz z podsumowaniem wykazują wagę i oryginalność osiągnięć doktorantki, które niniejszym pragnę podkreślić. Konsekwentnie udowodniła, że niescharakteryzowane dotąd białka enzymatyczne mają potencjalny udział w regulacji funkcji aparatu centralnego rzęski ruchomej. Swoje osiągnięcia przedstawiła jako podsumowanie w 14 punktach.

Pracę wieńczy 8 wniosków, które nawiązują do celów pracy. Mają one niewątpliwie duży impakt poznawczy i nowatorski charakter. W mojej ocenie stanowią one kolejny ważny krok w wyjaśnieniu budowy i mechanizmów regulacji ruchomości rzęsek ruchomych.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać, że autorka nie ustrzegła się kilku błędów o charakterze edytorskim. Numeracja w spisie treści dotyczącym metod jest błędna: zamiast numerów 4.9.3 jest 4.8.3 i zamiast 4.9.4 jest 4.8.4. Także w spisie treści, w części I dotyczącej wyników brakuje rozdziału 5.6 i całej części drugiej z podrozdziałami. Pomyłona jest także numeracja w tekście pracy i spisie treści kolejnych rozdziałów po „Dyskusji” - 5 zamiast 6, i tak konsekwentnie dalej, do końca.

Uwagi te w żaden sposób nie zmniejszają wagi osiągnięć badawczych doktorantki i bardzo pozytywnego odbioru pracy. Pragnę podkreślić, że bardzo nowoczesne narzędzia badawcze zastosowane przez doktorantkę są jak najbardziej właściwe i pozwalają na wiarygodne udzielenie odpowiedzi na stawiane w pracy pytania. Osiągnięcie wyników wymagało bardzo znaczących nakładów pracy, a jej konstrukcja była bardzo złożona.

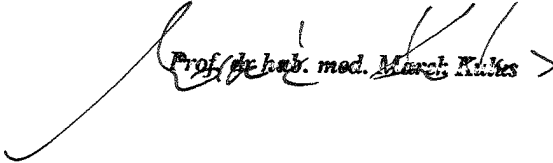
Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną pracy w tym oprawę graficzną, która nie tylko prezentuje część wyników, ale również zawiera ryciny obrazujące schemat i przebieg procesu badawczego.

Na przestrzeni ostatnich kilku lat postęp nauk podstawowych spowodował zmianę standardów i algorytmów rozpoznawania pierwotnej dyskinezy rzęsek. Obserwując ten postęp jako lekarz wierzę, że niebawem badania, o których dzisiaj rozmawiamy w kontekście czysto naukowym, staną się paliwem dla działań aplikacyjnych a co za tym idzie do uproszczenia diagnostyki i strategii postępowania w chorobach związanych z zaburzeniami ruchomości rzęsek.

Wyniki badań doktorantki z całą pewnością stanowią oryginalne, nowatorskie i ważne odkrycie, które stanowi kolejny etap w poznaniu budowy i mechanizmu ruchomości rzęsek, i przybliży nas do wyjaśnienia patomechanizmu ciliopatii.

Podsumowując, w mojej opinii rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Sekretarskiej „Białka rzęskowe potencjalnego szlaku kinaz MAP powiązane z aparatem centralnym rzęski ruchomej Tetrahymena.” w pełni spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie mgr inż. Justyny Sekretarskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

KIEROWNIK KLINIKI


Prof. dr hab. med. Marek Kulus >

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Sekretarskiej p.t.
„Białka rzęskowe potencjalnego szlaku kinaz MAP powiązane z aparatem centralnym rzęski ruchomej
Tetrahymena”

Z przyjemnością podjąłem się recenzowania pracy doktorskiej mgr inż. Justyny Sekretarskiej dotyczącej charakteryzacji nowych rzęskowych białek związanych ze szlakiem kinaz MAP i ich roli w regulacji aparatu centralnego rzęsek ruchomych.

W celu odkrycia nowych białek istotnych dla funkcji aparatu centralnego, Doktorantka wykorzystowała dane spektrometrii mas porównujące białka rzęskowe występujące w dzikich szczepach organizmu modelowego *Tetrahymena* z białkami rzęskowymi w szczepie pozbawionym wypustki C1b poprzez mutację białka Spef2a lub białka Cfp69. Wśród białek o znacząco zmienionej lokalizacji rzęskowej w mutantach, Doktorantka wytypowała białka związane ze szlakiem kinaz MAP oraz inne kinazy i fosfatazy i postawiła hipotezę, że białka mogą odgrywać kluczową rolę dla funkcji wypustek C1b i dla prawidłowego funkcjonowania rzęsek ruchomych.

We „Wstępie” Doktorantka podsumowuje obecny stan wiedzy na temat budowy i funkcji rzęsek. Szczególny nacisk kładzie na strukturę rzęsek ruchomych, a przede wszystkim na strukturę aparatu centralnego i jego rolę w fizjologicznym biciu rzęsek oraz w zespołach chorobowych. Załącza również przegląd literatury na temat roli kinaz MAP w fizjologii rzęsek. Przedstawia też organizm modelowy *Tetrahymena* i uzasadnia jego wybór w swoich badaniach. Rozdział ten napisany jest przejrzysto i uzupełniony o estetycznie wykonane ilustracje.

Następnie Doktorantka przedstawia „Cele pracy”. Założeniem rozprawy jest zbadanie wzajemnych oddziaływań oraz funkcji białek których ekspresja ulegała zmianie przy usunięciu wypustki C1b aparatu centralnego. Doktorantka stawia tezę, że białka te mogą stanowić pewnego rodzaju moduł sygnalizacyjny związany z funkcją kinaz MAP.

W „Materiałach i Metodach” Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje wykorzystane metody. Rozdział napisany jest bardzo rzetelnie i umożliwiłby powtórzenie przedstawionych badań nawet osobie z niewielkim doświadczeniem. W związku z tym recenzowana praca doktorska będzie stanowić cenne źródło informacji dla osób rozpoczynających pracę z orzęskiem *Tetrahymena*.

W części „Wyniki” Doktorantka opisuje badania wykonane w ramach pracy doktorskiej. Rozpoczyna od analizy filogenetycznej i domenowej badanych białek. Dość istotnym wynikiem opisanym tutaj jest fakt, że Dusp5 w *Tetrahymena* pozbawione jest kluczowej cysteiny w centrum aktywnym, co może świadczyć o utracie przez to białko funkcji enzymatycznej. Następnie Doktorantka pokazuje, że wszystkie badane białka lokalizują się do pewnego stopnia w rzęskach, choć lokalizacja ta w przypadku kilku z nich (Mapk3, Map2k7, Pp2c) jest niezbyt wyraźna. W kolejnych rozdziałach Doktorantka bada wzajemne oddziaływania wytypowanych białek metodami BioID, co-IP oraz pull-down, używając zarówno spektrometrii mas jak i western blot. W ostatniej części „wyników” Doktorantka przeprowadza analizę fenotypu szczepów *Tetrahymena* pozbawionych ekspresji Dusp5 i Kif9 i zauważa, że fenotypy te są stostunkowo łagodne w porównaniu do fenotypu nokauta genu Spef2a.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka umieszcza swoje wyniki w kontekście obecnego stanu wiedzy na temat badanych białek oraz struktury rzęsek ruchomych. W ostatnim rozdziale „Podsumowanie i wnioski” w sposób skrótowy opisuje swoje badania i wysnuwa z nich wnioski.

Pytania i uwagi krytyczne:

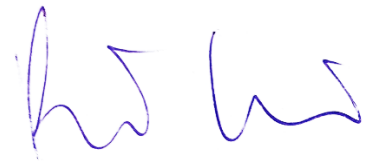
1. Zastanawiający jest wybór tytułu pracy, a szczególnie stwierdzenie „potencjalnego szlaku kinaz MAP”. O ile dwa z badanych białek Mapk3, Map2k7 są niewątpliwie związane ze szlakiem kinaz MAP, o tyle Dusp5 prawdopodobnie nie ma w *Tetrahymena* zachowanej ewolucyjnie funkcji fosfatazy kinaz MAP, a Nek6, Kif9 i Pp2c trudno jest bezpośrednio powiązać ze szlakiem MAP na podstawie danych literaturowych. Co więcej, wśród białek badanych metodami utraty funkcji Doktorantka nie uwzględniła dwóch białek które ze szlakiem MAP mają związek bezpośredni, mianowicie Mapk3 i Map2k7. Czy doktorantka dysponuje wynikami wskazującymi, że badane białka wpływają na fosforylację białek rzęskowych u *Tetrahymena* i że są powiązane z kaskadą kinaz MAP?
2. Badania metodą pull-down (Ryc. 30-33) są obarczone moim zdaniem pewnym ryzykiem ponieważ Doktorantka nie pokazuje wyników pull-down badanych białek pod nieobecność przynęty. Niektóre białka niespecyficznym wiążą się do złoża, dając wyniki fałszywie pozytywne w tej metodzie. Z tego względu, doświadczenia te powinno się zawsze wykonywać równolegle przy obecności i pod nieobecność przynęty i obie próbki powinno się rozdzielać na tym samym żelu, żeby móc bezpośrednio ocenić ilość badanego białka w kontroli i próbce badanej. Dodatkowo niepokojące jest, że nawet w obrębie tego samego doświadczenia poszczególne ścieżki żelu nie są porównywalne do siebie nawzajem, ponieważ Doktorantka umieszcza na jednej rycinie ścieżki z różnych żelów. Takie przedstawienie wyników utrudnia ich interpretację.
3. Na rycinie 33B ścieżki 2, 3, 4 są identyczne, a ścieżka 5 jest lustrzanym odbiciem ścieżek 2, 3, 4. Zakładam, że jest to błąd edytorski, ale dość poważny i uniemożliwiający interpretację tej ryciny.
4. Doktorantka twierdzi, że wyniki przedstawione na Ryc. 46 wskazują, że fosforylacja w komórkach Dusp5-KO może być obniżona w porównaniu z komórkami dzikimi. Trudno jest wyciągnąć taki wniosek z pojedynczego barwienia bez kontroli całkowitej ilości białka nałożonego na żel. Czy doktorantka wykonała do tego doświadczenia analizę całkowitej ilości białka i wykonała doświadczenie w kilku powtórzeniach, żeby upewnić się, że jej interpretacja jest uzasadniona? Co ciekawe, w Dyskusji, Doktorantka nie podtrzymuje tej interpretacji, pisząc, że „Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w poziomie fosforylacji pomiędzy komórkami szczepu typu dzikiego, a komórkami pozbawionymi białka Dusp5.”
5. Trudno jest zrozumieć stwierdzenie, że brak wykrycia interakcji między Spaf2a a badanymi białkami metodą BioID jest wynikiem zbyt niskiej „liczby biotynylowanych peptydów” by można je było wykryć metodą Western Blot. Peptydy wykrywane są w spektrometrii mas, natomiast w Western Blot wykrywane są niestrawione białka. Podobnie „przejściowe oddziaływanie” nie powinno być przeszkodą dla metody BioID, która właśnie powinna takie oddziaływania wykrywać z większą czułością niż koimmunoprecypitacja bądź pull-down, gdzie przejściowe oddziaływania traczone są ze względu na szybką dysocjację kompleksów.
6. W kilku miejscach Doktorantka wspomina, że wykrycie interakcji metodą pull-down wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie białek. Nie jest to prawidłowa interpretacja, przynajmniej nie w wariantcie pull-down który doktorantka wykonała w ramach swojej pracy. Białko-przynęta opłaszczające złożo może tworzyć trwałe kompleksy z innymi białkami w *Tetrahymena* i wówczas te kompleksy, a nie „nagie” białko-przynęta, będą opłaszczać złożo. Białka badane mogą oddziaływać z elementami tych kompleksów a nie bezpośrednio z białkiem-przynętą. Co więcej, białka badane również mogą tworzyć kompleksy więc i tutaj oddziaływanie może nie być bezpośrednie. Żeby pokazać bezpośrednie oddziaływanie białek, doktorantka musiałaby nadeksprimować badane białka (zarówno przynętę jak i ofiarę) w organizmie odległym ewolucyjnie od *Tetrahymena*, takim jak *E. coli*, w którym białka te nie tworzyłyby kompleksów.

Drobniejsze uwagi i niektóre literówki:

1. Streszczenie: „obniżenie tempo ruchu komórek” zamiast „tempa”
2. W spisie treści brakuje rozdziałów 5.6 i 5.7

3. Rozdziały 4.9.2 i 4.8.3 wydają się być w niewłaściwej kolejności
4. Tabele 9 i 10 są błędnie oznaczone jako 8 i 9
5. W Podsumowaniu i wnioskach Doktorantka opisuje Dusp5 jako „białko enzymatyczne” mimo, że wcześniej stwierdza, że Dusp5 może być pseudofosfatazą, a więc białkiem nie pełniącym funkcji enzymatycznej.

Powyższe uwagi jedynie nieznacznie wpływają jednak na moją ocenę przedstawionej pracy. Doktorantka stosuje nowoczesne i różnorodne metody aby zbadać oddziaływania i funkcję nowych białek w fizjologii rzęsek ruchomych. Pozostaje mieć nadzieję, że w najbliższym czasie wyniki uzyskane w przebiegu stażu doktorskiego Pani Justyny Sekretarskiej zostaną opublikowane w recenzowanym czasopiśmie, ponieważ dotychczas, o ile mi wiadomo, brakuje w jej dorobku z doktoratu oryginalnej pracy pierwszoautorskiej, a nawet jakiegokolwiek pracy eksperymentalnej. Mimo to, praca potwierdza, że Doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Biorąc powyższe pod uwagę 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 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr inż. Justyny Sekretarskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**



Paweł Niewiadomski