



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Biologii Komórki

ul. Rokietnicka 5D
60-806 Poznań

tel.: 61 854 71 70
fax: 61 854 71 69

Poznań, 10. października 2019 r.

prof. dr hab. Anna Jankowska
ajanko@ump.edu.pl
tel. 61 8547190

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Martyny Węglewskiej
pt.: „Charakterystyka funkcjonalna białka BEND3”**

Praca doktorska mgr Martyny Węglewskiej została wykonana pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Elżbiety Poręby w Zakładzie Wirusologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ z wyodrębnionymi podrozdziałami: Wstęp, Cel, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusja. W miejsce zwyczajowych wniosków wieńczących wyniki i ich dyskusję praca zawiera Podsumowanie wyników. Uważam, że jest to poważne uchybienie, jako że przyjmuje się, iż umiejętność formułowania odpowiednich wniosków świadczy o dojrzałości naukowej Autora.

Praca napisana jest na 170 stronach maszynopisu oraz dalszych 37 stronach zawierających: spis tabel i rycin, wykaz stosowanych skrótów oraz 467 pozycji literatury. Dokumentację wyników stanowią: dwie tabele prezentujące białka zidentyfikowane w interaktomie i oddziałujące z BEND3 oraz 35 rycin, w tym 11 fotografii, dokumentujących rekrutację białek, w tym BEND3 w miejscach uszkodzeń DNA. W sumie w pracy zamieszczono 3 tabele oraz 46 rycin.

Praca rozpoczyna się trzydziestostronicowym wstępem, w którym mgr Martyna Węglewska dogłębnie omawia dane literaturowe dotyczące typów uszkodzeń DNA oraz mechanizmy ich naprawy. W ostatniej części tego rozdziału Autorka opisuje budowę, strukturę i dotychczasową wiedzę dotyczącą funkcjonowania białka BEND3. Zawarte we wstępie informacje bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w temat pracy, są także istotne dla właściwej analizy przedstawionych wyników. Uważam, że byłoby warto pomyśleć o przygotowaniu na podstawie wstępu pracy artykułu poglądowego, który z pewnością zainteresuje szerokie grono czytelników.

W następnym rozdziale rozprawy mgr Martyna Węglewska przedstawia założenia i cele badawcze swojej pracy doktorskiej. Głównym celem podjętych badań było scharakteryzowanie białka BEND3 i poszerzenie wiedzy na temat jego funkcji.



Cel pracy podzielono na precyzyjnie sformułowane zadania badawcze, które obejmowały: (i) identyfikację białek oddziałujących z BEND3 w komórkach ludzkich, (ii) potwierdzenie oddziaływań pomiędzy BEND3 a wybranymi białkami jego interaktomu oraz (iii) wykazanie udziału białka BEND3 w naprawie uszkodzeń DNA. Wymienione przez Autorkę zadania badawcze zostały zrealizowane.

Następny rozdział rozprawy szczegółowo opisuje poszczególne szczepy bakteryjne i linie komórkowe, wektory ekspresyjne pozwalające na uzyskanie nadekspresji oraz metody wyciszenia genów kodujących analizowane białka. Przedstawia także metodykę prowadzonych badań oraz używane do tego celu odczynniki. Podkreślenia wymaga imponująca liczba konstruktów przygotowanych i analizowanych przez Autorkę.

Materiały i metody opisane są dokładnie i starannie. Jednak, by na ich podstawie można było bez przeszkód powtórzyć przedstawione eksperymenty, należałoby uzupełnić je o kilka szczegółów. W pracy nie podano informacji o pochodzeniu wykorzystywanych linii komórkowych. Należałoby także wyjaśnić dlaczego, w doświadczeniach wykorzystano różne linie komórkowe (HEK293TT w identyfikacji oddziaływań bezpośrednich BEND3 z białkami uczestniczącymi w naprawie DNA metodą Far-Western Blot; komórki HeLa lub U2OS w badaniach wykazujących udział białek w mechanizmie naprawy uszkodzeń DNA indukowanych wiązką lasera o długości 405 nm; komórki U2OS w badaniach wpływu wyciszenia Ku70 na rekrutację BEND3). Podobnie nie wyjaśniono, dlaczego stosowano niejednakowe protokoły transfekcji komórek.

Brak też informacji jaki materiał stanowił matrycę w reakcjach PCR pozwalających na przygotowanie konstruktów do wyprowadzenia stabilnych linii ekspresjonujących badane białka (rozdział 5.7. i 5.8.2.).

Ponadto, nie podano sekwencji oligonukleotydów shLUC wykorzystanych w reakcjach wyciszenia.

Nie wiadomo także, ile razy powtarzano eksperymenty, np. wyciszenie, koimmunoprecypitację, Far-Western Blot czy qPCR.

Obszerną, sześćdziesięcioczęściową część rozprawy stanowi przedstawienie i omówienie wyników. Wszystkie opisane w pracy doktorskiej obserwacje mają charakter doniesień oryginalnych, a ich dokumentacja nie budzi zastrzeżeń. Wśród wielu ważnych i interesujących wyników przedstawionych w rozprawie moim zdaniem na szczególne podkreślenie zasługują:

- zidentyfikowanie białkowych partnerów oddziałujących z BEND3, w tym białek: NuRD i NoRC, hDPY30, Ku70, Ku80, p53BP1, zaangażowanych w różnorodne procesy komórkowe, takie jak: remodelowanie chromatyny, naprawę DNA, metabolizm RNA czy proteosomalną degradację białek;
- wykazanie, że BEND3 może ulegać homooligomeryzacji;
- uwidocznienie, że BEND3 jest rekrutowane do miejsc uszkodzeń DNA indukowanych laserem emitującym fale o długości 405 nm i wyznaczenie kinetyki rekrutacji BEND3;
- dowiedzenie, iż akumulacja BEND3 w miejscach uszkodzeń DNA jest zależna od aktywności enzymatycznej PARP1 i jest modyfikowana w wyniku SUMOilacji BEND3;
- pokazanie, że białko BEND3 uczestniczy w mechanizmach naprawy dwuniciowych uszkodzeń DNA.



Wszystkie wyniki opisane przez mgr Martynę Węglewską zostały poddane konfrontacji z danymi literaturowymi w obszernym rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Rozdział ten świadczy o dobrej znajomości tematu oraz dowodzi, że Doktorantka z powodzeniem włącza się w nurt badań prowadzonych w kraju i za granicą. Uzyskane przez nią wyniki wnoszą nowe dane do badań dotyczących roli białka BEND3, w tym mechanizmów naprawy DNA.

Wydaje się, że w tej części pracy szerszego wyjaśnienia wymagałaby przedstawiona w rozdziale 6.2.2.2. (str. 99) bezpośrednia interakcja BEND3 z hDPY30, która wydaje się być wynikiem wcześniejszych doświadczeń przeprowadzonych w Zakładzie Wirusologii Molekularnej przez Annę Bieluszewską.

Wyjaśnienia wymagałoby, dlaczego badając udział BEND3 w mechanizmach naprawy DNA do wyciszenia genu kodującego Ku70 w komórkach U2OS zastosowano siRNA, a w komórkach HeLa dla zablokowania ekspresji tego białka oraz BEND3 użyto shRNA? Wybór ten zastanawia zwłaszcza w świetle przedstawionych wyników blokowania ekspresji z wykorzystaniem siRNA, który umożliwił wyciszenie Ku70 na poziomie 93%, w porównaniu do 56% wyciszenia Ku70 w przypadku użycia shRNA.

W tym miejscu chciałabym nadmienić, że wszystkie badania dotyczące rekrutacji BEND3 do miejsc uszkodzeń DNA prowadzono na liniach komórek nowotworowych, nie pokazując ani nie powołując się na badania w komórkach niezmiennych nowotworowo. W związku z tym rodzi się wątpliwość, czy mechanizmy działania BEND3 są identyczne w prawidłowych komórkach.

Należałoby także zadać pytanie, czy fakt, że część eksperymentów dotyczących analizy bezpośrednich oddziaływań między białkami wykonano na cząsteczkach uzyskanych w systemie prokariotycznym nie wpłynął na wyniki analizy interakcji?

Mimo staranności, która wyróżnia przedstawioną do recenzji pracę, nie udało się w niej uniknąć błędów językowych i nieścisłości o charakterze redakcyjnym. Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam kilka uwag dotyczących tych usterek:

- w tabelach zamieszczonych w rozdziale Materiały i metody znalazły się anglojęzyczne nazwy odczynników, np. enzymów (rozdział 5.3.2.), antybiotyków (rozdział 5.3.3.) czy składników koktajlu inhibitorów proteaz (rozdział 5.3.10.2.). Podobnie język angielski pozostawiono na rycinie 34. umieszczonej w wynikach;

- w tabeli charakteryzującej wektory ekspresyjne (rozdział 5.8.1.) przedstawiono dwa wektory pEGFP-C1 i -C3, które według zamieszczonego w pracy opisu są identyczne; nie podano, w jakich doświadczeniach wykorzystywano te plazmidy. Z kolei w opisie wektora pmCherry-C1-BEND3K512 pomyłono pozycję mutowanej lizyny. Brak też informacji o pochodzeniu wektora pBiFC-YN wykorzystanego o przygotowania białka hDPY30. Nie poddano także afiliacji osób, od których otrzymano wybrane konstrukty;

- w języku polskim wartości dziesiętne podaje się po przecinku, a nie kropce, jak ma to miejsce w języku angielskim.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Biologii Komórki

ul. Rokietnicka 5D
60-806 Poznań

tel.: 61 854 71 70
fax: 61 854 71 69

Przedstawione powyżej uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Martyny Węglewskiej. Uzyskane w pracy wyniki mają charakter doniesień oryginalnych i istotnych dla nauki wyników.

Na wyróżnienie zasługuje bogaty warsztat technik wykorzystanych przez Doktorantkę oraz fakt, że w pracy analizowano obszerny materiał, oceniając przy tym liczne zmienne. Obok klasycznych technik biologii molekularnej, pozwalających na klonowanie białek oraz ich mutantów czy analizę oddziaływań między białkami, Doktorantka z powodzeniem zastosowała metody biologii komórki, uzyskując nadekspresję oraz wyciszając geny, co pozwoliło określić rolę BEND3 w procesach naprawy DNA.

Należy podkreślić, że rozprawa dotyczy niezmiennie ważnego problemu związanego z wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów naprawy DNA prowadzących do szeregu zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, w tym do nowotworzenia. W tym kontekście wyniki Autorki wydają się mieć istotne znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne, gdyż w przyszłości mogą być wykorzystane w poszukiwaniu nowych terapii antynowotworowych.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa Doktorantki spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Węglewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wartość przedstawionych wyników i możliwości ich klinicznego zastosowania uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie.