



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Prof. dr hab. Janusz Maszewski
Katedra Cytofizjologii
Instytut Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki
Uniwersytetu Łódzkiego
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
Tel.: 48-42-6354512, E-mail: jamasz@biol.uni.lodz.pl

25 kwietnia 2016 r.

Rada Naukowa

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej Julii Kaźmierczak-Barańskiej „Charakterystyka funkcjonalna białek z rodziny striatyn”

Ulegając naturalnej pokusie klasyfikowania, biologowie zajmujący się funkcjami komórek zwykli niekiedy wartościować znaczenie funkcjonalne poszczególnych struktur, procesów i szlaków metabolicznych. Nie twierdzę, że to skłonność uzasadniona lub usprawiedliwiona naukowo. Gdybyśmy jednak, mimo wszystko, próbowali zracjonalizować ową skłonność w odniesieniu do systemu mikrotubul, będących w istocie rzeczy głównym obszarem zainteresowań badawczych mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej, wówczas jako miarę biologicznego znaczenia tych struktur trzeba by z pewnością przyjąć wielość warunkowanych przez nie zjawisk, ich kluczową rolę w organizacji zdarzeń zachodzących w cyklu komórkowym, udział w mechanice ruchu i segregacji chromosomów, lub choćby tylko liczbę towarzyszących im i współdziałających z nimi białek. Wszystko to jest zarazem miarą skomplikowania problemów związanych z funkcjonalną charakterystyką mikrotubul, a tym samym i miarą trudności prowadzonych nad nimi badań. Chociaż są one wspomagane coraz doskonalszymi technikami eksperymentalnymi, nasza wiedza o mechanizmach sterujących dynamiką mikrotubul wciąż jeszcze wydaje się być listą problemów nierozwiązanych. Wyjaśnieniu części z nich poświęcona jest rozprawa doktorska mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej. Inspiracją i punktem wyjścia Jej badań były wyniki wcześniejszych prac, zapoczątkowanych podczas podoktorskiego stażu dr Marcina Cieślaka w University of Pennsylvania, a następnie kontynuowanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot.

Głównym przedmiotem badań Doktorantki jest tytułowa striatyna, należąca do niewielkiej rodziny białek; zalicza się do nich także białko SG2NA i zinedinę. Striatyna występuje w komórkach wielu tkanek, jednak szczególnie wysoki poziom jej ekspresji jest typowy dla komórek ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Białko to wyizolowane zostało po raz pierwszy ze struktur prążkowania mózgu szczura, a lokalizuje się przede wszystkim w kolcach dendrytycznych, odbierających sygnały synaptyczne z sąsiednich neuronów. Striatyny charakteryzują się możliwością heterooligomeryzacji oraz znaczną, ponad 80% homologią pod względem sekwencji aminokwasów, głównie w domenach odpowiedzialnych za interakcje z innymi białkami. Pełniąc rolę platform, biorą prawdopodobnie udział w formowaniu złożonych kompleksów białkowych o zróżnicowanych funkcjach biologicznych. Obiektem swych prac doświadczalnych mgr Julia Kaźmierczak-Barańska uczyniła transformowane i unieśmiertelnione komórki linii HEK293T, które – choć wyprowadzone z ludzkich komórek embrionalnych nadnercza – wykazują liczne cechy neuronalne i zbliżony profil ekspresji neurospecyficznych genów.

Jasno zdefiniowane zadania badawcze sformułowane w rozprawie doktorskiej mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej wiążą się z obserwacjami sugerującymi wspólną lokalizację striatyny i mikrotubul. Zbieżność ta implikować może ich zdolność do bezpośredniego łączenia się lub tworzenia asocjacji za pośrednictwem białek MAP i tau, które towarzyszą mikrotubulom i są czynnikami ich stabilizacji. To, co wydaje się jednak szczególnie istotnym i motywującym aspektem poznawczym, to możliwość regulacyjnego wpływu striatyn na funkcjonowanie układu mikrotubularnego i zależne od niego procesy komórkowe. Racjonalnym uzasadnieniem tak sformułowanej hipotezy jest udział striatyny w tworzeniu wielopodjednostkowego holoenzymu fosfatazy serynowo-treoninowej 2A (PP2A), pełniącej kluczową rolę w fosforegulacji białek zaangażowanych w mechanizmach kontroli przebiegu cyklu komórkowego, replikacji DNA, transkrypcji, nowotworzeniu, morfogenezie, sygnalizacji komórkowej, apoptozie, rearanżacji struktur cytoszkieletu oraz wielu innych procesach. Białka z rodziny striatyn są także elementami stosunkowo niedawno zidentyfikowanych kompleksów STRIPAK, w których kolokalizacja fosfatazy PP2A i kinazy z rodziny GCKIII oraz zmienny skład innych komponentów tworzyć może multifunkcyjny mechanizm biochemicznego przełącznika, zdolnego zarówno do autoregulacji, jak i aktywacji procesów komórkowych uwarunkowanych przemiennością fosforylacji i defosforylacji substratów białkowych.

Dla biologa, który podejmuje próbę wyjaśnienia choćby części spośród wielu nierozwiązanych jeszcze problemów związanych z funkcjami aparatu mikrotubularnego, szczególnie istotne staje się precyzyjne sformułowanie celów poznawczych, wyznaczenie poszczególnych etapów badań i dobór właściwych środków do ich realizacji. Rozprawa doktorska mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej dobrze spełnia każde z tych wymagań. Opisując główny cel swych poszukiwań, a więc próbę określenia charakteru związku pomiędzy striatyną a mikrotubulami oraz potencjalnej roli tego związku w regulacji aktywności proliferacyjnej komórek HEK293T, Autorka przedstawia szczegółowy plan zadań

eksperymentalnych, anonsując przy tym dostosowaną do nich metodykę badań. Informacje te poprzedzają dobrze skonstruowany „Wstęp literaturowy”, którego pierwszy podrozdział w zwięzły sposób opisuje budowę i polarność mikrotubul, wyjaśnia mechanizmy ich dynamicznej niestabilności związane z polimeryzacją i depolimeryzacją heterodimerów α - i β -tubuliny oraz czynniki decydujące o funkcjonalnym zróżnicowaniu mikrotubul, wśród których Autorka wymienia obecność izoform cząsteczek tubuliny, jej modyfikacje potranslacyjne i oddziaływania z białkami MAP towarzyszącymi mikrotubulom. Bardziej szczegółowy wgląd w aktualny stan wiedzy o budowie, lokalizacji i biologicznych funkcjach białka tau oraz izoform białek MAP1 i MAP2 przedstawia Doktorantka w kolejnym podrozdziale swojej rozprawy. W jej trzeciej części, na tle ogólnych informacji o procesach fosforegulacji, mgr Julia Kaźmierczak-Barańska opisuje białkową fosfatazę 2A, w której funkcję podjednostki regulatorowej holoenzymu pełnić mogą striatyny. Tej rodzinie białek, znajdujących się w głównym nurcie zainteresowań badawczych Autorki, poświęcony jest kolejny podrozdział teoretycznego wstępu do Jej rozprawy. Stanowi on dobrze skonstruowany i usystematyzowany przegląd aktualnego stanu wiedzy o striatynie, jej strukturze umożliwiającej interakcje z wieloma partnerami białkowymi, o funkcjach przypisywanych poszczególnym domenom białka oraz ich potencjalnym znaczeniu w regulacji wielu procesów komórkowych. Ta – moim zdaniem najciekawsza część Wstępu – nie tylko wyjaśnia homologie i różnice wielodomenowej organizacji cząsteczek striatyny, białka SG2NA i zinedyny, ale przynosi także opis wielu innych białek, które wchodzą wraz z fosfatazą PP2A w skład wielofunkcyjnego kompleksu STRIPAK o istotnym znaczeniu dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego. Jestem przekonany, że po dokonaniu odpowiednich uzupełnień oraz starannej korekcie, informacje zawarte w tej części Wstępu, mogłyby stanowić podstawę wartościowego artykułu przeglądowego. W końcowym podrozdziale opisu teoretycznego, Autorka koncentruje się na modelu swych badań. Charakteryzując komórki linii HEK293T, wprowadza czytelnika w kontekst własnego układu doświadczalnego.

O rzeczywiście, merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej i mojej wysoce pozytywnej ocenie pracy mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej decydują przede wszystkim rezultaty Jej badań własnych. Opis prawidłowo udokumentowanych wyników, opatrzonych odpowiednimi testami kontrolnymi, Autorka przedstawia łącznie z dyskusją nad efektami kolejnych etapów swojej pracy w formie zwięzłych komentarzy, dobrze osadzonych w kontekście poszczególnych zadań badawczych. W poszukiwaniu odpowiedzi na pytania, jakie wyznaczone zostały poprzez precyzyjnie sformułowane cele poznawcze, Doktorantka zaangażowała bogaty zestaw metod współczesnej biologii molekularnej, m.in. technikę immuno- i koimmunoprecypitacji, Western-blot, RT-PCR, frakcjonowanie i ultrawirowanie, cytometrię przepływową, testy na aktywność kaspaz określające stopień indukcji apoptozy oraz test MTT do oceny liczby komórek linii HEK293T, a także technikę wyciszania aktywności genów poprzez transfekcję zaprojektowanymi dupleksami siRNA, immunohistochemię,

mikroskopię konfokalną. Szczegółowy opis użytych w swojej pracy materiałów i technik badawczych zamieściła Autorka w końcowej części swojej rozprawy doktorskiej.

Opis wyników własnych badań, Doktorantka rozpoczyna od analiz wskazujących na wysoką zawartość striatyny w lizatach komórek HEK293T, zbliżoną poziomem do komórek ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y. Równoległe przeprowadzone doświadczenia potwierdziły także obecność wysokocząsteczkowych izoform nieufosforylowanych i ufosforylowanych białek MAP2 oraz białka tau. Ta podstawowa weryfikacja staje się dla mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej punktem wyjścia do Jej dalszych badań nad oddziaływaniem striatyny z katalityczną podjednostką białkowej fosfatazy 2A, tubuliną i białkami towarzyszącymi mikrotubulom. Krzyżowo zaprojektowane analizy z użyciem techniki Western-blot przynoszą wynik potwierdzający specyficzne oddziaływanie striatyna-fosfataza PP2A, jednak nie pozwalają na potwierdzenie bezpośrednich interakcji między striatyną a tubuliną, mimo wyraźnie dostrzegalnej w mikroskopie fluorescencyjnym kolokalizacji obu białek w regionach o wysokim stopniu zagęszczenia mikrotubul. Komentując ten wynik w świetle badań innych autorów, Doktorantka sugeruje pośredni wpływ striatyny, poprzez innych partnerów białkowych, podkreślając w tym kontekście rolę podjednostki regulatorowej B fosfatazy PP2A oraz znaczenie holoenzymu PP2A w kontroli poziomu ufosforylowania białek MAP2 i stabilizacji mikrotubul. Pogląd ten znajduje poparcie w wynikach dalszych badań mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej, ujawniających formowanie się kompleksów striatyny z wysokocząsteczkową izoformą białka MAP2. Zastosowanie techniki Western-blot po koimmunoprecypitacji kompleksów białkowych nie wykazuje jednak bezpośredniej asocjacji striatyny z białkiem tau. Zgodnie z interpretacją Doktorantki, zróżnicowanie zdolności striatyny do bezpośredniego wiązania się z cząsteczkami MAP2 i tau wynika prawdopodobnie z odmiennej lokalizacji i wewnątrzkomórkowych funkcji obu białek.

Wśród wielu istotnych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej, do najważniejszych zaliczyć trzeba rezultaty Jej badań nad obniżeniem ekspresji genów striatyny, SG2NA i zinedyny po transfekcji komórek linii HEK293T przy użyciu siRNA o sekwencjach komplementarnych do kodujących regionów dojrzałych cząsteczek mRNA dla poszczególnych białek. Efektywność działania siRNA oceniana była techniką Western-blot w przypadku striatyny, natomiast metodą RT-PCR w badaniach nad hamującym wpływem siRNA na ekspresję białek SG2NA i zinedyny. Obniżenie poziomu biosyntezy samej tylko striatyny w komórkach HEK293T, poprzez zastosowanie najskuteczniejszego ze skonstruowanych siRNA, prowadzi do dwukrotnego wzrostu poziomu ufosforylowania MAP2, co – zgodnie z sugestią Autorki – wydaje się potwierdzać udział striatyny w wewnątrzkomórkowej dystrybucji innych, współdziałających z nią białek, a wśród nich fosfatazy 2A. Naturalną konsekwencją uzyskanych wyników staje się więc próba dokonania oceny wpływu, jaki obniżona ekspresja genu striatyny wywierać będzie na aparat mikrotubularny komórek HEK293T oraz na procesy uzależnione od jego funkcjonalnej sprawności: tempo podziałów mitotycznych, rozkład populacji w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oraz stopień indukcji

apoptozy. Chociaż wyciszenie ekspresji genów striatyny i skorelowana z tym hiperfosforylacja białek MAP2 powoduje jedynie niewielki procentowy wzrost liczby komórek zaklasyfikowanych do subpopulacji G0/G1 i nieznaczne zmniejszenie względnej liczebności komórek w fazie S, każdy z użytych do transfekcji rodzajów siRNA powodował wykrywalną testem MTT redukcję tempa wzrostu populacji komórek HEK293T. Kontrintuicyjnym efektem w tym kontekście, może wydawać się ujawnione przez Doktorantkę obniżenie aktywności proapoptotycznych kaspaz 3 i 7, co – Jej zdaniem – wskazywać może na hipotetyczny udział tych białek w sterowaniu mechanizmami kontrolnymi cyklu komórkowego.

Celem kolejnych doświadczeń mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej było sprawdzenie czy – a jeśli tak, to w jakim stopniu – do wzmocnienia wcześniej obserwowanych efektów przyczyni się wyciszenie ekspresji nie tylko samej striatyny, ale także – jednocześnie – dwóch innych białek jej rodziny, SG2NA i zinedyny. Przeprowadzone analizy wykazały, że zastosowanie mieszaniny siRNA najskuteczniej obniżających poziom każdej z trzech striatyn prowadzi do stosunkowo nieznacznego tylko przyrostu względnej liczby komórek w fazie G0/G1 (kosztem ich udziału w fazie S) i w niewielkim tylko stopniu nasila efekt spowolnienia tempa podziałów komórek HEK293T. Wyciszenie ekspresji wszystkich striatyn nie wpływa także znacząco na aktywność kaspaz 3 i 4.

Istotną wartością recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej jest jej merytoryczna spójność, wyrażająca się jasnością sformułowanych celów i konsekwencją w realizacji planowanych zadań badawczych. Niewątpliwym osiągnięciem mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej są nie tylko nabyte przez Nią i w pełni udokumentowane możliwości, jakie stwarzają nowoczesne techniki biologii molekularnej, ale także ich umiejętne użycie w zmaganiach z równie ciekawym, co trudnym problemem dotyczącym biologicznej roli striatyn. Chociaż nie wszystkie wyniki odpowiadają na postawione przez Autorkę pytania, w najmniejszym stopniu jednak nie należy tej uwadze nadawać rangi zarzutu. Nasze doświadczenia nie zawsze wykazują zgodne z oczekiwaniami zależności przyczynowo-skutkowe. To – moim zdaniem – oczywisty efekt tego, że każda zmiana w ilości lub biologicznej aktywności produktu białkowego niemal zawsze ujawnia się w kontekście zbiorowym i przynosi nie jeden lecz wiele skutków naraz. Dzieje się tak szczególnie często wówczas, gdy nasze eksperymentalne działania dotyczą tych czynników i mechanizmów, które umiejscowione są wysoko, nadrzędnie w stosunku do końcowych efektów fenotypowych. Być może jest tak w przypadku striatyn poprzez wpływ, jaki białka te wywierają na biologiczne funkcje fosfatazy 2A.

Dość rzadko spotykane w rozprawach doktorskich połączenie wyników badań własnych z elementami dyskusji, układ rozdziałów pracy, jej styl oraz jakość dokumentacji oceniam pozytywnie. Pewne wątpliwości budzi we mnie sposób w jaki mgr Julia Kaźmierczak-Barańska opisuje i komentuje ilościowe wyniki analiz systemu mikrotubularnego. Doktorantka w jednoznaczny sposób utożsamia względną zawartość α -tubuliny, wykrywalną metodą Western-blot, z – jak to wielokrotnie określa – ilością mikrotubul. Wobec znacznej labilności tych struktur zastosowana technika badawcza

– bez względu na sposób izolacji cytoszkieletu – pozwala jedynie na dokonanie szacunkowej oceny liczby podjednostek białkowych stanowiących pulę substratów, z których zbudowane są krótsze lub dłuższe mikrotubule, nie pozwala jednak na określenie ich liczebności, która tylko może – ale nie musi – korespondować z ich stabilnością. Kontrargumentem dla mojej tezy nie może być także wzrost poziomu α -tubuliny wywołany taksolem oraz spadek jej poziomu pod wpływem nokodazolu, chociaż skądinąd wiadomo, że pierwszy z tych związków stabilizuje mikrotubule, a drugi prowadzi do ich skracania. W kontekście relacji między pulą wolnej tubuliny a liczebnością mikrotubul pojawia się więc problem kontroli autogenicznej. Liczę tu na krótki komentarz Doktorantki podczas obrony tej Jej rozprawy.

O ile moja wcześniejsza uwaga ma charakter polemiczny, bez większego wahania postawić muszę zarzut zbyt swobodnej interpretacji wymogu, jakim jest konieczność dokonania szczegółowej, końcowej korekty pracy. Myślę tu przede wszystkim o sposobie cytowania literatury. Bez sukcesu zakończyły się moje poszukiwania – w końcowym spisie bibliografii – około 17 źródłowych publikacji anonsowanych w tekście rozprawy. To szacunkowa liczba, bowiem trudno ustalić ją dokładnie ze względu na dość częste błędy w datach publikacji. Dodatkową trudność sprawia stosowana przez Doktorantkę prezentacja nazwiska tylko pierwszego autora. Prawdziwą zagadką było dla mnie także wyjaśnienie, którą z dwóch prac zamieszczonych w spisie literatury cytuje Doktorantka, jeśli obie miały szczęście ukazać się w jednym roku, lecz na nieszczęście (dla recenzenta), ich pierwszym autorem była ta sama osoba. Rozwiązanie zagadki jest proste - trzeba przeczytać obie prace. Nie przyznam się, jak dalece sięgała moja dociekliwość.

Wszystkie te uwagi nie mają żadnego wpływu na końcową, bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej, dla której miarą rzeczywistej wartości mogą być jedynie efekty pracy włożonej przez mgr Julię Kaźmierczak-Barańska w osiągnięciu podjętych celów badawczych (co z pewnością nie było zadaniem łatwym), wnikliwość i rzeczowy opis przeprowadzonych analiz. Miałem przyjemność recenzować dobrze wykonaną pracę o istotnym znaczeniu poznawczym; jej wyniki przyniosły nie tylko cenne odpowiedzi na wiele ważnych pytań, ale ukazały także szereg nowych problemów. Z uznaniem stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Julii Kaźmierczak-Barańskiej 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. nr 65, poz. 593 z późniejszymi zmianami) i składam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi wniosek o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do publicznej obrony.



prof. dr hab. Janusz Maszewski