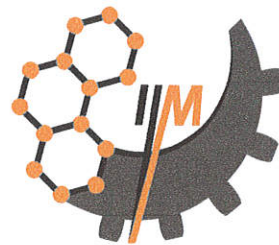




Politechnika Łódzka

Instytut Inżynierii Materiałowej



## OCENA

pracy doktorskiej Pani mgr Bożeny Skupień-Rabian, zatytułowanej: „*Analysis of influence of selected antipsychotic drugs on the nuclear proteome of a rat brain cortex*”. Ocena wykonana została na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Prof. dr hab. Andrzeja Kozika.

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Biochemii Fizycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem Pani dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok, prof. UJ.

Z przedstawionych informacji wynika, że Doktorantka uczestniczyła w Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej “Społeczeństwo-Środowisko-Technologia” prowadzonej w latach 2013-2016 przez UJ, otrzymała stypendium doktorskie w ramach konkursu NCN ETIUDA 5 (nr UMO-2017/24/T/NZ3/00294) i w ramach tego stypendium odbyła staż naukowy w Instytucie Biologii Układów Molekularnych, na Wydziale Biologii ETH Zurich, Szwajcaria, a w ramach programu Erasmus+ odbyła staż w Centrum Regulacji Genomicznych w Barcelonie, Hiszpania. Ponadto Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii był partnerem Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) wspieranego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Niezależnie od tego uczestniczyła w realizacji czterech projektów badawczych (jeden współfinansowany przez EU, dwa finansowane przez NCN i jeden finansowany przez MNiSW). Według bazy Web of Science (dostęp z dnia 02.11.2021) Doktorantka opublikowała łącznie 17 publikacji, które cytowane były 189 razy, a współczynnik Hirscha osiągnął wartość  $H=7$ .

Praca obejmuje 246 stron, włączając w to 81 rysunków (w tym 76 w pracy i 5 w materiałach uzupełniających), 24 tabele (w tym 13 w pracy i 11 w materiałach uzupełniających), dwa bloki tekstowe w materiałach uzupełniających zawierające polecenia użyte w procesie budowania bazy spektralnej i w docelowej ekstrakcji danych, a także 405 pozycji literatury oraz wykaz dorobku naukowego. Praca zawiera: streszczenie, spis użytych skrótów, wstęp literaturowy zawierający podstawowe informacje o obiekcie badań, metodach badawczych i schemacie eksperymentu, cele badań, część doświadczalną z opisem metod badawczych i zastosowanych materiałów, wyniki badań z podziałem na stosowane metody badawcze, dyskusję, wnioski, spis cytowanej literatury, materiały uzupełniające, prawa autorskie oraz wybrane osiągnięcia naukowe Doktorantki. Praca napisana jest w języku angielskim ze streszczeniem dostępnym także w języku polskim.

Rozwój technik badawczych w naukach o życiu, a w szczególności na poziomie badań molekularnych, pozwolił na nowe spojrzenie na przyczyny i mechanizmy powstawania i rozwoju chorób, a także dostarczył nowych możliwości ich diagnostyki i zwalczania. Powoli przyzwyczajamy się do niezwykłych do niedawna osiągnięć w traktowaniu chorób nowotworowych z wykorzystaniem metod biologii molekularnej, w tym edycji genów (przykładowo CRISPR/Cas9) i stosowania szczepionek mRNA. Te ostatnie udowodniły także swoją przydatność w prewencji zakażeń wirusem SARS-COV2.



Celowo przywołałem tutaj choroby nowotworowe oraz trapiącą nas od dwóch lat pandemię COVID-19, bo są one bardzo dobrze rozpoznawane społecznie, choć nie zawsze akceptowane jest ich istnienie i proponowany przez naukę sposób postępowania. Zdecydowanie mniejsza jest wiedza i społeczne zainteresowanie chorobami o podłożu psychicznym, co w pewien sposób znajduje swoje odzwierciedlenie w niedoborach zarówno specjalistów, jak i infrastruktury szpitalnej i dostępności skutecznej terapii. Tym niemniej problemy dotyczące tej niedocenionej sfery zdrowia człowieka pozostają bardzo istotne społecznie i zasługują na zwiększoną uwagę i zwiększone finansowanie. W świetle powyższego zainteresowanie Doktorantki problemami działania leków przeciw psychotycznych zasługuje na szczególne uznanie.

Manuskrypt rozpoczyna się streszczeniem dobrze ujmującym treść całej rozprawy. Następnie Doktorantka przedstawiła zarys informacji o zaburzeniach psychicznych, ze szczególnym uwypukleniem schizofrenii oraz wyczerpującą informację o lekach przeciw psychotycznych i różnym spektrum ich działania. Kolejno wskazane zostały słabo reprezentowane w komórce białka odpowiedzialne za kontrolę transkrypcji (TF) i ich dominująca frakcja określana jako białka wewnątrznie nieuporządkowane (IDP). Białka te w znacznej liczbie zlokalizowane są w jądrze komórkowym. Kolejno scharakteryzowane zostało proteomiczne podejście do analizy profilu białek i peptydów komórkowych z wykorzystaniem bezżelowych metod opartych na połączeniu chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej oraz zaawansowanej analizy bioinformatycznej widm masowych. Następnie przedstawiony został schemat wariantów eksperymentu pozwalającego na analizę wzbogaconych jądrowych frakcji białek IDP, oraz schemat pobierania tkanki kory mózgowej szczura. Ta wstępna część pracy przygotowana została z należytą uwagą i w znacznej mierze oparta została na publikacjach własnych Doktorantki

W kolejnym rozdziale (rozdział 2) przedstawione zostały cele badawcze. Jako cel pracy przyjęto analizę wpływu przewlekłego traktowania wysoce skuteczną klozapiną i często terapeutycznie stosowanym risperidonem na proteom jądrowych kory szczura. Poza tym wskazano pięć celów szczegółowych, w założeniu prowadzących do osiągnięcia głównego celu pracy. Cele badawcze zostały przedstawione w sposób czytelny i nie budzący wątpliwości, a zakres zaplanowanych do wykonania prac budzi podziw.

W rozdziale materiały i metody (rozdział 3) przedstawione zostały metody hodowli komórek HEK293 (ludzkie embrionalne komórki nerki), izolowania jąder komórkowych tych komórek, izolowania białek jądrowych i białek z pełnego lizatu komórkowego, wzbogacenia frakcji białek IDP, przygotowania próbek do analizy proteomicznej i warunki analizy z wykorzystaniem systemu chromatografii cieczowej sprzężonego ze spektrometrem masowym micrOTOF-Q II (kwadrupolowy filtr mas i analizator TOF). Do analizy uzyskanych wyników wskazano wykorzystanie baz danych i narzędzia bioinformatyczne do oceny białek IDP i ontologii genów (GO). Dla tak samo przygotowanych próbek przewidziano ponowną analizę z wykorzystaniem systemu spektrometrii mas Q Exactive (kwadrupolowy filtr mas i analizator Orbitrap).

Następnie zostały zaprezentowane warunki hodowli zwierząt (szczury), schematy podawania badanych leków (klozapina i risperidon), pobierania tkanki z obszarów kory mózgowej i jej regionu przedczołowego, homogenizacji tkanki i izolowania jąder komórkowych, a następnie izolowania białek jądrowych i wzbogacania frakcji białek IDP oraz przygotowanie próbek do badań metodą LC-MS. Zaprezentowano trzy strategie badawcze: analizę w trybie zależnym od danych (data dependent analysis – DDA), celowaną analizę proteomiczną (parallel reaction monitoring – PRM) oraz analizę w trybie niezależnym od danych (data-independent acquisition-based - SWATH-MS). Podano warunki pracy i zastosowany sprzęt, a w dalszej kolejności strategię analizy uzyskanych wyników wraz



ze strategią przygotowania bibliotek widm masowych. Rozdział ten zawiera wszystkie istotne informacje dotyczące metod badawczych i materiałów użytych w pracy.

W rozdziale czwartym, zatytułowanym Wyniki, przedstawione zostały wszystkie uzyskane wyniki badawcze wraz z wynikowymi analizami bioinformatycznymi. Rozdział ten jest bardzo obszerny i zajmuje 65 stron manuskryptu oraz dodatkowo 46 stron materiałów uzupełniających. Rozdział przygotowany został w sposób czytelny i graficznie stosunkowo łatwy do analizy, choć objętość i ładunek informacji zawarty w tym rozdziale stanowi spore wyzwanie dla czytelnika.

W kolejnym, piątym rozdziale, zaprezentowana została Dyskusja uzyskanych wyników. Zapewne dla ułatwienia lektury tekst ten podzielony został na dwa podrozdziały z dalszym podziałem odpowiednio na cztery i dwie części. Nie wdając się w szczegółową ocenę dyskusji należy stwierdzić, że Doktorantka podołała niełatwemu zadaniu analizy i dyskusji tak obszernego materiału badawczego.

W ślad za dyskusją przedstawione zostały Wnioski zgrupowane w jedenastu punktach. Trudno oprzeć się wrażeniu, że Doktorantka dokonała w tym fragmencie manuskryptu skróconego podsumowania całej pracy, a poszczególne punkty korespondują z najważniejszymi uzyskanymi osiągnięciami. Zabrakło mi w tym miejscu podstawowego wniosku wskazującego, że założone cele pracy zostały osiągnięte. Oczekiwałbym także jednego lub dwóch wniosków natury bardziej ogólnej wynikających z uzyskanych wyników, a odnoszących się do wpływu na komórki kory mózgowej, lub skuteczności działania, badanych leków przeciw psychotycznych. Niezależnie od mojego krytycznego podejścia do przedstawionych wniosków, na uwagę zasługuje ta wielkoskalowa eksperymentalna analiza jądrowego subproteomu białek IDP.

Czytając i analizując przedstawioną mi pracę odniosłem wrażenie pewnego rodzaju przerostu treści pracy w stosunku do tego, czego spodziewałem się. Ten przerost w znacznym stopniu utrudniał lekturę, pomimo tego, że praca napisana jest łatwym i komunikatywnym językiem. Spróbuję skonkretyzować swoje negatywne odczucia w celu poddania ich dyskusji:

1. Nie jest dla mnie zrozumiałe, dlaczego Doktorantka zdecydowała się włączyć do pracy opublikowane już wyniki dotyczące badań proteomu komórek HEK293. Przecież wystarczyło odwołać się do tych opublikowanych wyników i nie umniejszałoby to rangi pracy doktorskiej, a w znaczący sposób zmniejszyłoby objętość manuskryptu i poprawiło jego komunikatywność.
2. Czy koniecznym było wykorzystanie trzech różnych metod proteomiki bezzłowej (tryb zależny od danych (data dependent analysis – DDA), celowana analiza proteomiczna (parallel reaction monitoring – PRM) oraz analiza w trybie niezależnym od danych (data-independent acquisition-based - SWATH-MS)? Jeżeli tak, to poproszę o krótkie wskazanie odniesionych korzyści.
3. Czytając tekst dysertacji odniosłem wrażenie, że uzyskane wyniki są w znacznej części uzależnione od zastosowanej metody badawczej. Czy moje odczucie jest fałszywe, a jeżeli nie, to jak można znormalizować uzyskane wyniki, aby uniezależnić się od metody badawczej?

W kategoriach dyskusji bardziej ogólnej chciałbym zapytać:

4. Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na pracę z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, choć sama stwierdziła w treści pracy, że wyników takich badań nie dają się przenieść w sposób bezpośredni na organizm człowieka? Tym bardziej, że dostępne są neuronalne komórki z obszaru kory mózgowej człowieka (przykładowo HCN-1A, # CRL-10442 w katalogu American Type Culture Collection)? Tym samym uzyskane wyniki mogłyby być bezpośrednio

analizowane z punktu widzenia organizmu człowieka, a jednocześnie możliwa byłaby rezygnacja z udziału w badaniach zwierząt doświadczalnych.

5. Czy przeprowadzono ocenę stopnia udziału komórek innych niż neuronalne w preparatach uzyskanych z kory mózgowej szczura? Chodzi mi głównie o komórki tworzące kapilarne naczynia krwionośne? A jeżeli nie, to czy obecność tych komórek w homogenacie mogła mieć wpływ na uzyskane wyniki i mogła zakłócić ich analizę.
6. Jaki był powód wykorzystania w doświadczeniach z komórkami HEK293 dwóch różnych systemów spektrometrii masowej różniących się zasadą pomiaru wartości m/z (TOF i Orbitrap). Jaki praktyczny wniosek wynika z porównania uzyskanych wyników?
7. Czy mechaniczne zeszkrobienie komórek z powierzchni naczynia hodowlanego ma zalety w stosunku do enzymatycznego odzepiania komórek (trypsynizacja)?

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i z natury krytycznych uwag stwierdzam, że praca jest bardzo wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze, a przede wszystkim dokumentuje dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki. Praca w całości wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinę nauki biologiczne.

Wobec powyższego oceniana praca spełnia wymagania stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami zamieszczonymi w Ustawie z dnia 21 kwietnia 2017 roku.

Przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Bożeny Skupień-Rabian do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej pracy.

Dobra-Nowiny, 08 listopada 2021

*Beata Wallochy*