



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 23 sierpnia 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Reginy Kikulskiej:
Efektywność działania punktu kontrolnego wrzeciona (Spindle Assembly Checkpoint)
podczas mejozy oocytów myszy**

Praca doktorska Pani mgr Reginy Kikulskiej powstała w Pracowni Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem był prof. Zbigniew Polański.

Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy mówiącej, że osłabienie efektywności działania punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego (SAC) w oocytach myszy może prowadzić do zaburzeń podziałów oraz aneuploidii. Na aktywność SAC wpływano stosując odpowiednie inhibitory szlaków przekazywania sygnałów oraz manipulując objętością cytoplazmy badanych oocytów. W pracy wykorzystano myszy OF1 oraz myszy szczepu LT/Sv. Oocyty LT/Sv przez wiele dziesięcioleci stanowiły model badawczy pozwalający na analizę zaburzeń mejozy prowadzących do zablokowania podziałów, zaburzeń funkcjonowania SAC czy spontanicznej aktywacji partenogenetycznej, prowadzącej do powstawania potworniaków w jajnikach samic.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 160 stron, z czego *Wstęp* stanowi 43 strony, *Materiały i metody* 20 stron, *Wyniki* 28 stron, *Dyskusja* 12 stron. Ponadto, praca zawiera *Spis treści*, *Indeks skrótów*, *Indeks figur*, *Indeks tabel*, wymagane *Streszczenia* w języku polskim i angielskim i *Bibliografię* (47 stron, po 9-10 prac na stronę).

Wstęp został przygotowany niezwykle starannie. Zaczyna się od opisu dojrzewania mejotycznego oocytów myszy, regulacji cyklu komórkowego i podziałów. Ważny jego fragment stanowi opis punktów kontrolnych, które odpowiadają za prawidłowy przebieg cyklu. Bardzo precyzyjnie opisane są białka kontrolujące SAC oraz zjawisko "checkpoint slippage" - a więc główni bohaterowie pracy doktorskiej. W końcu, opisany został fenotyp myszy szczepu LT/Sv, które charakteryzują się zaburzeniami mejozy prowadzącymi do aktywacji partenogenetycznej zarówno na stadium metafazy I jak i metafazy II. Ten bardzo dobry model badawczy stracił w ostatnich latach na popularności i w sumie szkoda, że nikt dotychczas, w dobie transkryptomiki, proteomiki i innych omic nie wskazał na czym polega defekt regulacji mejozy oocytów tego szczepu myszy. Mam wrażenie, że Doktorantka,

Promotor i recenzenci i to ostatni fani LT/Sv. *Wstęp* ilustrowany jest świetnymi schematami, napisany jest bardzo dobrze, lekko, zawiera odniesienia do kluczowych odkryć w dziedzinie prowadzonych badań i z całą pewnością mógłby posłużyć jako podstawa do przygotowania pracy przeglądowej. Wymagałby tylko drobnego sprawdzenia faktów - np. ustalenia oocyty jakiego gatunku płazów badał Masui (Masui i Markert, 1971).

Materiały i metody zostały przygotowane w sposób precyzyjny i nie budziły moich większych wątpliwości. Cele doktoratu mgr Regina Kikulska zrealizowała wykorzystując przede wszystkim techniki klasycznej embriologii eksperymentalnej - uzyskiwanie i hodowlę oocytów myszy, uzyskiwanie ich fragmentów (jądrowych i beźjądrowych), indukowania fuzji komórek z wykorzystaniem wirusa Sendai (dlaczego akurat tę metodę wybrano?), stosowania inhibitorów mejozy, immunodetekcji tubuliny. Zastosowanie tych metod w prowadzonych badaniach z całą pewnością pozwoliło jej na świetne opanowanie warsztatu badawczego.

Założenie i cele pracy zostały przedstawione w sposób bardzo obszerny. Są one raczej streszczeniem planów badawczych niż prezentacją hipotez. Niemniej jednak dobrze wprowadzają czytelnika w opis wyników. Realizowany projekt miał na celu: 1) testowanie hipotezy, że obniżona aktywność SAC w oocytach ssaczych może związek z rozmiarem tych komórek; 2) określenie dlaczego w oocytach LT/Sv SAC nie jest inaktywowany w sposób prawidłowy; 3) określenie czy stopniowe przełamywanie SAC w oocytach LT/Sv jest przejawem "checkpoint slippage". Wszystkie cele zostały skrupulatnie zrealizowane.

Podobnie jak poprzednie fragmenty pracy także *Wyniki* podzielone zostały na podrozdziały. Zaczynają się od przedstawienia, w jaki sposób opracowano model badawczy, w którym SAC byłby aktywowany w sposób kontrolowany. Doktorantka pisze, że określała wpływ substancji zaburzających dynamikę mikrotubul na poziom aktywności SAC. To, że SAC jest aktywny pokazała jednak w sposób pośredni, trudno więc mówić o określaniu "poziomu" aktywności. Skuteczne zastosowanie inhibitora SAC oczywiście jest dowodem na to, że mechanizm ten działał. Ale jednak nasuwa mi się pytanie dlaczego nie wykorzystano bardziej bezpośrednich metod określenia czy SAC jest aktywowany, np. immunolokalizacji białek SAC na kinetochorach?

Kolejny rozdział pracy to opis niezwykle ciekawych doświadczeń, podczas których Doktorantka manipulowała objętością cytoplazmy oocytów sprawdzała jaki jest wpływ takich zabiegów na aktywność SAC. Wykazała, że zmniejszenie objętości oocyty w stadium GV wzmacnia aktywność SAC. Potwierdziła tym samym wyniki pracy Kyogoku i Kitajimy (2017) opublikowanej jeszcze przed zakończeniem doktoratu. Zwiększenie objętości oocyty osłabia aktywność SAC. Podobne doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem oocytów, które przeszły GVBD nie doprowadziło do podobnych efektów. Co ciekawe, Doktorantka wykazała, że oocyty LT/Sv mają większą średnicę, jednak nie prowadzi to do osłabienia SAC. Różnice w wielkości nie były jednak tak drastyczne jak w przypadku oocytów doświadczalnych.

Kluczowy dla pracy jest rozdział 4.6 w którym opisano wyniki badań prowadzących do ustalenia przyczyn stopniowego wychodzenia z bloku metafazowego przez oocyty LT/Sv. Doświadczenia miały za zadanie odpowiedzieć na pytanie czy w oocytach MI tego szczepu myszy pojawia się CSF a tym samym przejmuje funkcje SAC powodując, że oocyty nie kończą pierwszego podziału czy

aktywny jest inny mechanizm, tzw. "checkpoint slippage". Doświadczenie, w którym analizowano morfologię wrzeciona podziałowego jedynie pośrednio weryfikowało pierwszą hipotezę. Opierało się bowiem o założenie, że "defekt" związany jest z budową wrzeciona. Tymczasem zarówno w oocytach LT/Sv jak i kontrolnych, w których SAC aktywowano nokodazolem morfologia wrzeciona była normalna. A jak doskonale jest to dyskutowane w dalszej części pracy przyczyny mogą być niewykrywalne zastosowanymi tu metodami.

Następne doświadczenia, testujące "checkpoint slippage" dostarczyły przesłanek, że właśnie ten mechanizm mógłby być odpowiedzialny za stopniową inaktywację SAC. Jednak ostatnia grupa analiz mająca na celu weryfikację hipotezy, że na przebieg mejozy wpływa wiek samic LT/Sv, wykazała że oocyty starszych samic kończyły I podział mejotyczny wcześniej niż pochodzące od młodszych myszy. Muszę przyznać, że zwroty akcji opisane przez Doktorantkę doskonale dokumentują to jak wiele, mimo nakładów czasu i funduszy, jeszcze pozostaje do zrobienia, aby w pełni zrozumieć przebieg mejozy oocytów ssaków.

Wszystkie doświadczenia wykonane były w co najmniej trzech powtórzeniach, z wykorzystaniem dużej liczby oocytów. Dokumentacja *Wyników* jest bardzo dobra. Świetnej jakości schematy, fotografie oraz wykresy ułatwiają śledzenie prowadzonych badań i uzyskanych wyników.

Doktorantce udało się więc pogłębić charakterystykę punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego aktywnego w dojrzewających oocytach myszy i rzucić nowe światło na podłoże zaburzeń występujących w oocytach nieprawidłowo przechodzących mejozę. Część wyników potwierdza już istniejące dane część jest nowatorska, wszystkie są bardzo dobrze udokumentowane. Czy istnieją plany opublikowania tych danych? Nie znalazłam informacji, że to już się stało...

W *Dyskusji* uzyskane dane zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Mgr Regina Kikulska krytycznie podeszła do efektów swojej pracy i obficie się do nich odwołując ulokowała je na tle prac innych badaczy. Odpowiedziała na większość pytań, które miałam podczas lektury *Wyników*. Na przykład o to, jaka mogłaby być inna przyczyna obserwowanego "defektu" oocytów? Czy, można byłoby zastosować inny test w sposób bardziej bezpośredni wykazujący aktywność lub brak aktywności CSF (pomijając stosowanie opisanych w pracy inhibitorów)? Itd. Szkoda, bo w zasadzie nie mam o co pytać. Co ważne, bardzo dobrze przedyskutowane zostały aspekty medyczne związane z zaburzeniami mejozy. Chciałam podkreślić, że także ten rozdział świadczy o bardzo rozległej wiedzy i dojrzałości Doktorantki. Last but not least, *Dyskusja*, tak jak poprzednie rozdziały, była pięknie ilustrowana.

Praca nie zwiera wydzielonego podsumowania. Także poszczególne jej rozdziały nie zawierają wniosków podsumowujących opisane doświadczenia. Tego mi trochę brakowało.

Rozprawa doktorska napisana jest dobrym językiem. Czytało się ją bardzo dobrze. Chociaż rzecz jasna pewne (nieliczne) wady miała. Przykładowo, znalazłam (podobnie jak w innych pracach doktorskich) traktowanie oocytów "stężeniem odczynnika" a nie "odczynnikiem o stężeniu" takim to a takim czy rozdzielną pisownię nie z imiesłowami.

Podsumowując, pani mgr Regina Kikulska zrealizowała wszystkie postawione cele. Przeprowadzone przez nią badania doprowadziły do weryfikacji postawionych hipotez. Rzuciły nowe światło na

mechanizmy regulujące dojrzewanie oocytów ssaków. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania artukułu 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Ciemerych