

Olsztyn, 27.05.2019 r.

Prof. dr hab. n. med.
Marcin Mycko
Kierownik
Kliniki Neurologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego

**Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora
magister Magdaleny Zygmunt**

„Wpływ leków psychotropowych na ekspresję alternatywnych transkryptów w mózgu”

Jako recenzent Rozprawy na Stopień Naukowy Doktora, autorstwa magister Magdaleny Zygmunt, wykonanej w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, której promotorem jest dr hab. Jan Rodriguez Parkitna, przy udziale promotora pomocniczego dr Michał Korostyńskiego, pragnę podkreślić śmiałość i wagę tematu podjętego przez Doktorantkę. Techniki wielkoskalowego profilowania transkryptomu, pozwalając na pełne poznanie profilu ekspresji genów, przyniosły rewolucję w naukach biomedycznych. Dzięki tym metodom, zamiast zawężania się do analizy wybranych transkryptów, stało się możliwe niemal nieograniczone przeprowadzanie poszukiwań naukowych, bez konieczności przyjęcia wstępnych założeń czy wybiórczych hipotez. Niestety, możliwość pełnej interpretacji wyników badań wielkoskalowych jest nadal ograniczona koniecznością przeprowadzenia analizy ogromu danych generowanych przez te techniki, co powoduje konieczność poznania i umiejętnego wykorzystania całej baterii metod bioinformatycznych. Wyzwaniem dla „systems biology”, której celem jest integracja danych pochodzących z technik wielkoskalowego profilowania procesów biologicznych, jest właśnie zdolność do połączenia zaawansowanych technik bioinformatycznych i biostatystycznych z kontekstem biologicznym badanego zjawiska. Z przyjemnością stwierdzam, iż przedstawiona mi Rozprawa jest świetnym przykładem, jak należy podchodzić do analizy danych wielkoskalowych, oraz jak wiele informacji mogą one przynieść. Doktorantka w swoim projekcie wykazała unikalną zdolność do połączenia różnych metod badawczych, od zaawansowanej analizy bioinformatycznej, badań *in silico*, technik analizy ekspresji indywidualnych genów, aż po badania proteomiczne celem potwierdzenia obecności produktu białkowego. Mogę więc śmiało zaliczyć mgr Zygmunt do ekskluzywnego grona naukowców zdolnych do syntezy i translacji szerokiego typu technik i danych. Co więcej, Doktorantka podjęła się opisanie zmian tak skomplikowanego narządu, jak mózg i tak złożonego procesu, jak działanie leków psychotropowych. Dlatego szczególnie wysoko oceniam podjętą w niniejszej Pracy Doktorskiej analizę zmian RNA w mózgu pod wpływem substancji psychotropowych i próbę translacji funkcjonalnej uzyskanych wyników.

Rozprawa obejmuje łącznie 129 stron tekstu i podzielona została na 6 głównych rozdziałów: Wstęp, Cel badań, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski. Rozprawa zawiera 7 tabel, w tym 4 tabele dodatkowe. Tekst obejmuje też 26 rycin, z których większość przedstawia wyniki oryginalne. Tabele i ryciny zostały przedstawione bezpośrednio przy odpowiadającym im tekście Rozprawy, a tabele dodatkowe, zawierające rozległe wyniki, zostały umieszczone na końcu tekstu. Taki sposób organizacji znacznie ułatwia interpretację przedstawionych wyników. Piśmiennictwo obejmuje 264 pozycje, w przeważającej części prac oryginalnych i wyłącznie pozycje anglojęzycznych, ułożonych według kolejności pojawiania się w tekście. Cytowane publikacje są trafnie dobrane, co było niełatwe, bo literatura dotycząca analizy transkryptomu, procesów ekspresji genu, jak i mechanizmów działania substancji psychotropowych jest bardzo rozległa. Wymienione pozycje piśmiennicze są trafne i prezentują obecny stan wiedzy, co dowodzi, iż Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w aktualnej literaturze dotyczącej tematu Rozprawy.

Wstęp Rozprawy dobrze ilustruje wagę badań nad molekularnym tłem działania substancji psychotropowych, oraz szczególnej roli jaką mogą odgrywać w tym zakresie zmiany transkryptomu. Nie mam żadnych wątpliwości, iż Doktorantka świetnie orientuje się w tej tematyce. Rola i mechanizm działania leków psychotropowych są od przynajmniej kilkunastu lat przedmiotem intensywnych badań, ze znaczącymi osiągnięciami w tym zakresie Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Ciągłe jednak jesteśmy dalecy od pełnego zrozumienia wszystkich aspektów oddziaływania różnych leków psychotropowych. Doktorantka jest w pełni świadoma tego faktu i bardzo dobrze przedstawia zarówno uznane modele funkcjonowania badanych przez siebie substancji, jak i nowe, nie zawsze zgodne z tym obrazem dane. Cały Wstęp ma przejrzysty i logiczny układ, stanowiąc bardzo udane wprowadzenie do dalszych części rozprawy.

Założenia i cele pracy są ambitne, adekwatne do aktualnego stanu wiedzy i stanowią bardzo logiczną konsekwencję wcześniejszych odkryć Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej. W rozdziale „Materiały i metody” Autorka zawarła opis próbek materiału wykorzystanego w badaniach, metodyki przeprowadzonych badań laboratoryjnych oraz listę i protokoły szerokiego spektrum narzędzi bioinformatycznych wykorzystanych w analizach przeprowadzonych celem pełnego zrozumienia uzyskanych danych. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż wykorzystane metody zostały opisane bardzo dokładnie, z dbałością o szczegóły i niuanse techniczne, co dowodzi znakomitego warsztatu Doktorantki. Analiza statystyczna została przeprowadzona rzetelnie i adekwatnie do założeń badania.

Kolejny rozdział, Wyniki, obejmuje opis rezultatów przeprowadzonych analiz. Doktorantka uzyskała bardzo szeroki zakres danych dotyczących zmian transkryptomu spowodowanych podawanymi substancjami. Autorka umiejętnie posłużyła się całym panelem programów bioinformatycznych, oraz analiz *in silico*, aby poznać potencjalne znaczenie obserwowanego wpływu zmian RNA jako mechanizmu działania podawanych leków. Wyniki badań z wykorzystaniem technik wielkoskalowego profilowania transkryptomu bardzo skrupulatnie potwierdziła wykorzystując analizy ekspresji poszczególnych form najciekawszych

transkryptów. Te wyniki zostały rozwinięte w dalszej części Pracy, gdzie Doktorantka podjęła się oceną ekspresji alternatywnych transkryptów, w szczególności genu *Dclkl1*. Badania te doprowadziły do identyfikacji nieznanego dotąd produktu tego genu, transkryptu *Dclkl1-m*. Co więcej Autorka przeprowadziła analizę proteomiczną celem wykazania, iż transkrypt *Dclkl1-m* może ulegać translacji prowadząc do wytworzenia swoistego produktu białkowego. Mam następujące pytania odnośnie rozdziału „Wyniki”:

1. Doktorantka identyfikuje liczne alternatywne transkrypty charakteryzujące się „retencją intronu”, szczególnie w obrębie Grupy 3 opisywanych RNA. Wynik ten sugeruje możliwość globalnej zmiany procesu dojrzewania mRNA i promowania takich właśnie form. Czy profil Grupy 3 wskazuje na istnienie takiego zjawiska, a jeśli tak, to czy pokazuje możliwy mechanizm (np. zmiany „spliceosomu”)?

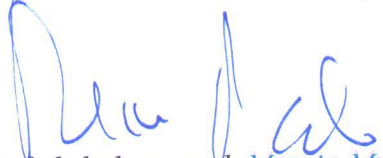
2. Ekspresja *Dclkl1* jest znanym markerem dla komórek kepkowych („tuft cells”) w przewodzie pokarmowym. Czy coś wiadomo o wpływie mianseryny na tę populację komórek?

W rozdziale Dyskusja Autorka przeprowadziła analizę uzyskanych wyników. Na szczególne wyróżnienie zasługuje swoboda Doktorantki w omawianiu wyników, pomimo rozległego zakresu analizowanych zmian. Stwierdzenie pojawiania się nowego, dotąd nieopisanego transkryptu genu *Dclkl1*, czy obecność wariantów z „retencją intronu” słusznie zostały wymienione przez Autorkę jako nowe zjawiska o nieznanym dotąd znaczeniu dla funkcjonowania mózgu. Nie mam wątpliwości, iż recenzowana Rozprawa ma charakter nowatorski i stanowi istotny wkład w reprezentowaną dziedzinę nauki, a zidentyfikowanie nowych form ulegających znaczącej zmianie w wyniku podawania substancji psychotropowych *in vivo*, stanowi istotne i znaczące odkrycie. Rozdział poświęcony Podsumowaniu i wnioskowi jest rzetelnym odzwierciedleniem uzyskanych wyników w kontekście założeń pracy. Wydzielenie Wykazu wybranych skrótów, oraz spisów rycin i tabel ułatwiają orientację w tekście. Na wyróżnienie zasługuje schludność, klarowność i estetyka całej Rozprawy. Doktorantka ukazuje talent nie tylko w zakresie pracy naukowej i laboratoryjnej, ale także jako autor umiejący przejrzysto przekazać tematykę i wyniki swoich trudnych i rozległych badań.

W podsumowaniu recenzji mam przyjemność stwierdzić, iż rozprawa magister Magdaleny Zygmunt spełnia wszystkie wymagania stawiane pracownikom na stopień doktora i stawiam wniosek o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie tej Pracy Doktorskiej.

Z poważaniem

Kierownik Kliniki Neurologii



prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko