

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski
Katedra Fizjologii i Toksykologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Bydgoszcz 05.05.2023 r.

Ocena osiągnięcia naukowego

pt. „Rola zegarów peryferycznych w regulacji rytmów okołodobowych”
oraz dorobku naukowego, dydaktycznego, popularyzatorskiego i organizacyjnego
dr Mileny Damulewicz,
ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne

Podstawa formalna recenzji

Podstawą do opracowania oceny jest Uchwała Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w sprawie powołania komisji habilitacyjnej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr Milenie Damulewicz, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne i wyznaczenie mojej osoby jako recenzenta komisji.

Recenzje opracowano w oparciu o przedstawione dokumenty:

Dane Wnioskodawcy (załącznik nr 1)

Autoreferat w języku polskim i angielskim (załącznik nr 2)

Kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora (załącznik nr 3)

Oświadczenia autorów o udziale w publikacji (załącznik nr 4)

Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia (załącznik nr 5)

Kopie pozostałych publikacji (załącznik nr 6)

Spis publikacji (załącznik nr 7)

Spis doniesień konferencyjnych (załącznik nr 8)

Obowiązujące przepisy prawa na dzień wszczęcia ocenianego postępowania habilitacyjnego

W momencie wystąpienia Kandydatki z wnioskiem o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, obowiązujące wymagania w tym zakresie zostały ujęte w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). Zgodnie z art. 219 wyżej cytowanej ustawy stopień doktora habilitowanego nadaje się w szczególności osobie, która: 1) posiada stopień doktora; 2) posiada w dorobku osiągnięcia naukowe (...), stanowiące znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny; 3) wykazuje się istotną aktywnością naukową (...) realizowaną w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej (...), w szczególności zagranicznej.

Rozwój zawodowy habilitantki

Pani dr Milena Damulewicz jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W roku 2007 uzyskała tytuł magistra nauk biologicznych na podstawie pracy magisterskiej pt. *„Okolodobowa ekspresja białka mPer1 oraz reszt cukrowych glikokoniugatów w komórkach Panetha jelita krętego myszy karmionych nocą”*, przygotowanej w Zakładzie Cytologii i Histologii, Instytutu Zoologii. W tym samym roku uzyskała uprawnienia pedagogiczne w Studium Pedagogicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W roku 2010 Kandydatka uzyskała dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie Biomateriały - materiały dla medycyny na Akademii Górniczo – Hutniczej w Krakowie. W roku 2012 obroniła na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pracę doktorską pt. *„Lokalizacja i funkcja kryptochromu w układzie wzrokowym Drosophila melanogaster”*. Od roku 2009 Kandydatka jest pracownikiem Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, od 2020 roku jest adiunktem na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki. Warto podkreślić, że w okresie po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych Pani dr Milena Damulewicz odbyła **pięć** zagranicznych staży w renomowanych ośrodkach badawczo-naukowych, w tym w roku 2013 staż podoktorski w Institute of Entomology,

Czech Academy of Science podczas którego, w zespole badawczym dr David Dolezela, realizowała projekt badawczy pt. "Establishment of *Pyrrhocoris apterus* as a new model species for chronobiology". W roku 2018 Habilitantka odbyła 8 - miesięczny staż w ramach stypendium Mobilność Plus w grupie badawczej dr Fernandy w National Scientific and Technical Research Council w Argentynie. Natomiast w roku 2019 Kandydatka odbyła roczny staż w Padova University we Włoszech w ramach stypendium im. Bekkera finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. Realizowała również wiele zadań badawczych wspieranych w ramach projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych (NCN, NAWA) pełniąc 4-krotnie funkcję kierownika oraz 4-krotnie funkcję głównego wykonawcy tych projektów.

Ocena osiągnięcia naukowego (art. 219, ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce)

Osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne jest cykl czterech publikacji powiązanych tematycznie, ujętych pod wspólnym tytułem: „Rola zegarów peryferycznych w regulacji rytmów okołodobowych”.

Ocena formalna osiągnięcia naukowego

Oceniane osiągnięcie naukowe stanowi cykl monotematycznych 4 oryginalnych prac twórczych, opublikowanych w latach 2017-2022:

Damulewicz M, Ispizua JI, Ceriani F, Pyza E. (2020) "Communication Among Photoreceptors and the Central Clock Affects Sleep Profile". *Front Physiol.* 11:993.

Damulewicz M, Mazzotta GM, Sartori E, Rosato E, Costa R, Pyza EM. (2017) "Cryptochrome Is a Regulator of Synaptic Plasticity in the Visual System of *Drosophila melanogaster*". *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:165.

Damulewicz M., Doktor B., Baster Z., Pyza E. (2022) „The role of glia clocks in the regulation of sleep in *Drosophila melanogaster*". *Journal of Neuroscience*, JN-RM 2340-21

Damulewicz M., Szypulski K., Pyza E. (2022) „Glia – neurons cross – talk regulated through autophagy”. *Frontiers in Physiology*, 13:886273

Wyżej wymienione publikacje naukowe są dostępne na internetowych stronach wydawnictw naukowych oraz zaopatrzone w cyfrowy identyfikator dokumentu elektronicznego (DOI).

Łączna wartość naukometryczna publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe według listy Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) zgodnie z rokiem opublikowania artykułów wynosi 480 punktów. Sumaryczny współczynnik wpływu impact factor (IF) wyżej wymienionych publikacji wynosi 20,546.

Wyżej wymienione oryginalne prace twórcze (publikacje naukowe) składające się na oceniane osiągnięcie naukowe zostały w sposób zwięzły opisane na 7 stronach Autoreferatu (załącznik nr 2), w którym:

Kandydatka zamieściła przegląd literatury naukowej dotyczącej roli zegara biologicznego w regulacji rytmów okołodobowych oraz podstawowego modelu w takich badaniach a mianowicie *Drosophila melanogaster*.

Kandydatka przedstawiła główny cel badań wyżej wymienionych prac, tj: zbadanie wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi oscylatorami oraz mechanizmów, dzięki którym mogą regulować rytmy okołodobowe.

Następnie przeprowadziła syntezę opublikowanych 4 oryginalnych prac twórczych obejmującą cele, zakres badań, zastosowane metody w poszczególnych pracach oraz przedstawiła osiągnięte wyniki badań.

Ocena czy publikacje stanowią monotematyczny cykl publikacji

Merytoryczna analiza treści przedłożonych 4 oryginalnych prac twórczych oraz zamieszczonego opisu w Autoreferacie, pozwala uznać je za jedno tematyczny cykl publikacji naukowych. Decydują o tym wspólne cele główne oraz zakres badawczy ocenianych prac. Ponadto oryginalne prace twórcze zostały opublikowane w okresie 6 lat (2017-2022), co wskazuje na ciągłość merytoryczną prezentowanych przez Kandydatkę badań naukowych.

Ocena wkładu Kandydatki w poszczególne prace twórcze

Spośród przedstawionych 4 oryginalnych prac twórczych we wszystkich pracach twórczych, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, Habilitantka jest współautorem, zamieszczonym na pierwszym miejscu. We wszystkich czterech pracach jest również autorem korespondencyjnym. Kluczowe dla uznania tych opracowań, jako elementu osiągnięcia naukowego Kandydatki, jest wykazanie dominującej Jej roli w wyżej wymienionych publikacjach. W załączniku 4 do przedłożonej dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów prac włączonych w zakres osiągnięcia naukowego. Kandydatka zamieszczając oświadczenia Współautorów wykazała swój udział w poszczególnych publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe. Oświadczenia są podpisane przez współautorów i od strony formalnej przygotowane prawidłowo.

Ocena merytoryczna osiągnięcia naukowego

Zebrane w cyklu prace przedstawiają wyniki badań, które miały określić wzajemne powiązania pomiędzy poszczególnymi oscylatorami zegara biologicznego i mechanizmami dzięki którym mogą regulować rytmy okołodobowe. Kandydatka w swojej pracy badawczej skupiła się na zagadnieniu oscylatorów peryferycznych i molekularnych podstawach ich funkcjonowania w zmiennych warunkach. Badania realizowano na owadzie modelu, *Drosophila melanogaster*, który jest podstawowym modelem w badaniach chronobiologicznych, jak również badaniach genetycznych wielu schorzeń i chorób w tym także u ludzi. W badaniach wykorzystano różne typy mutantów *D. melanogaster*.

W publikacji I Habilitantka przedstawiła wyniki badań dotyczących wpływu światła, jako jednego z najważniejszych czynników regulujących rytmiczne zachowanie *Drosophila melanogaster*. W pracy zbadano rolę określonych typów fotoreceptorów i oscylatorów obwodowych zlokalizowanych w tych komórkach w regulacji wzorca snu. Przeprowadzone badania wykazały, że fotoreceptory z ekspresją rodopsy 1 i 3 biorą udział w regulacji snu nocnego, natomiast komórki z ekspresją Rh5 i Rh6 wpływają na sen zarówno w dzień, jak i w nocy. Ponadto Habilitantka wykazała, że fotoreceptory R8 odpowiadają za regulację czasu trwania sjesty w trakcie dnia, natomiast oczka Hofbauer-

Buchnera za sen w ciągu nocy. Dodatkowo wykazano, że interneurony L2, które odbierają sygnał z R1-6, wykazują zmiany poziomu wapnia w trakcie dnia i nocy, co sugeruje różnice dobowe w ich aktywności, co może wpływać na efektywność procesu fototransdukcji. Pozwoliło to na wysnucie wniosku, że oscylatory znajdujące się w fotoreceptorach siatkówki mogą bezpośrednio wpływać na regulację pracy neuronów zegara i w efekcie regulować sen. Część eksperymentów przedstawionych w publikacji I została wykonana w ramach stypendium Mobilność Plus w National Scientific and Technical Research Council (CONICET) w Argentynie.

W publikacji II Habilitantka skupiła się na roli kryptochromu w układzie wzrokowym *Drosophila melanogaster*. W badaniach wykazano, że CRY poza wiązaniem z TIM i PER, może także tworzyć kompleks z białkiem presynaptycznym Bruchpilot (BRP), a regulacja jego poziomu w trakcie dnia jest zależna od CRY. Interakcja ta została potwierdzona przy użyciu różnych nowoczesnych technik analitycznych, takich jak precipitacja immunologiczna, drożdżowy system dwuhybrowy (Y2H), Proximity Ligation Assay (PLA) czy spektroskopia masowa. Przedstawione wyniki sugerują, że CRY i BRP mogą oddziaływać bezpośrednio, szczególnie w świetle, ale nie wykluczają, że oba białka mogą być częścią większego kompleksu *in vivo*. Wykazano, że CRY reguluje stabilność BRP, prawdopodobnie odzwierciedlając już wcześniej poznane interakcje między CRY i TIM. Jak wykazały analizy z zastosowaniem metody Western blot regulacja poziomu BRP w głowie jest bardziej złożona. Przedstawiono także dane wskazujące że funkcjonalność układu wzrokowego jest upośledzona u owadów z ekspresją konstytutywnie aktywnej formy CRY (Δ CRY). Sugeruje to, że rola wywierana przez CRY na rozwój i fizjologię układu wzrokowego jest większa niż obecnie się uważa, a dalsze badania w tym obszarze są niezbędne.

Publikacja III i IV dotyczą roli oscylatorów zlokalizowanych w komórkach glejowych w regulacji rytmów okołodobowych. Dzięki wykorzystaniu zwierząt transgenicznych z nadekspresją zmutowanej formy białka CYC (Δ CYC) w wybranych komórkach, wykazano, że zegar w komórkach glejowych pełni istotne funkcje w regulacji poziomu snu, zarówno

w trakcie dnia jak i w nocy. Oscylatory obwodowe w komórkach glejowych mają działanie pobudzające. Habilitantka wykazała, że astrocyty oraz glej chiazmy wzrokowej są odpowiedzialne za utrzymanie rytmiki stopnia rozgałęzienia wypustek neuronów zegara sLNv w grzbietowej części mózgu, natomiast glej epitelialny reguluje amplitudę tych zmian. W pracy podjęto także próby identyfikacji mechanizmu, dzięki któremu komórki glejowe mogą regulować procesy behawioralne. Habilitance udało się wykazać, że glej epitelialny uczestniczy w tworzeniu synaps trójdzielnych w obrębie kartusza wzrokowego oraz w regulacji neurotransmisji. Kontynuując badania nad rolą gleju w regulacji rytmów okołodobowych w publikacji IV kandydatka badała autofagię w gleju. Dotychczas wiedza na temat okołodobowej regulacji autofagii i jej wpływu na funkcjonowanie mózgu jest słabo poznana. Przeprowadzone badania mające na celu porównanie ekspresji genów w różnych porach doby z zastosowaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym pozwoliły Habilitantce wykazać, że autofagia w gleju zachodzi w sposób rytmiczny, a jej poziom jest wyższy w trakcie godzin nocnych. Wyciszenie ekspresji genów *atg5* i *atg7* skutkujące zaburzeniem autofagii powoduje zwiększony poziom snu w trakcie nocy. Tożsame eksperymenty wykonane z zastosowaniem szczepów transgenicznnych potwierdziły, że zmiany poziomu snu wcześniej obserwowane u szczepów *wild type* były wynikiem zaburzenia autofagii w astrocytach, natomiast inne komórki glejowe nie regulowały tego procesu.

Zaplanowane przez Habilitantkę badania zostały dobrze przeprowadzone i ciekawie zinterpretowane, co znalazło odzwierciedlenie w cyklu 4 artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe Habilitantki. Na szczególną uwagę zasługuje wachlarz metod analitycznych wykorzystywanych do realizacji części badawczej. Na podkreślenie zasługuje także złożoność każdego z badań.

Ocena pozostałego dorobku naukowego (aktywności naukowej) Kandydatki

Obok dorobku zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego, Kandydatka wykazuje się dorobkiem naukowym prac niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego o współczynniku oddziaływania 130,251 i wartości sumarycznej 3120 punktów MEiN. Liczba cytowań prac z udziałem Habilitantki wg Web of Science wynosi 1314, a współczynnik Hirscha 11. Kandydatka po uzyskaniu tytułu doktora prezentowała wyniki badań na 23

międzynarodowych i 3 krajowych konferencjach oraz 10 międzynarodowych i 6 krajowych konferencjach przed obroną doktoratu.

Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Poza działalnością naukową Dr Milena Damulewicz jest zaangażowana w pracę dydaktyczną i organizacyjną. Prowadziła liczne zajęcia dla studentów kierunków Biologia i Neurobiologia. Była promotorem 6 prac licencjackich, obecnie pod jej opieką prace wykonuje dwójka licencjatów oraz dwójka magistrantów. Godne podkreślenia jest pełnienie funkcji promotora pomocniczego dwóch przewodów doktorskich (dr Bartosz Doktor, 2020; dr Bernadetta Bilska, 2022). Była współorganizatorem Festiwalu Nauki, Nocy Biologów oraz Nocy Naukowców. Od 2019 roku jest członkiem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika, pełniąc funkcję Sekretarza Zarządu. Jest również członkiem Society for Research on Biological Rhythms. Brała udział w organizacji międzynarodowej konferencji Neurofly 2018, pełniąc funkcję sekretarza tejże konferencji.

Ocena końcowa

Dr Milena Damulewicz posiada dorobek naukowy, spełnia wymagania stawiane w odnośnych przepisach dotyczących procedury habilitacyjnej (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). Uznając całokształt działalności naukowej dr Mileny Damulewicz za znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne w szczególności przyczyniający się do postępu wiedzy w zakresie roli zegarów biologicznych w regulacji rytmów okołodobowych. Dodatkowo Kandydatka wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną z instytucjami naukowymi i to głównie zagranicznymi. Biorąc także pod uwagę działalność dydaktyczną i organizacyjną Habilitantki składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego Pani Milenie Damulewicz w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Prof. dr hab. Jan Gajewski