



dr hab. Weronika Rupik
Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski w Katowicach
e-mail: weronika.rupik@us.edu.pl
tel. 32-359-18-20

Katowice, 08 stycznia 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Jadwigi **JABŁOŃSKIEJ**

pt. „**Analiza funkcjonalna małego białka szoku cieplnego Hsp67Bc w układzie modelowym
*Drosophila melanogaster***”,

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Daczewskiej prof. nadzw. UWr. – promotora oraz
dr Magdy Dubińskiej-Magiery – promotora pomocniczego w Zakładzie Biologii Rozwoju Zwierząt
Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego

Badania naukowe zaprezentowane przez Doktorantkę wpisują się w nurt badań nad udziałem małych białek szoku cieplnego (ang. **small heat shock proteins, sHsps**) w procesach embriogenezy organizmów modelowych oraz wpływu ekspresji tych białek na funkcję mięśni szkieletowych prowadzonych w Zakładzie Biologii Rozwoju Zwierząt przez zespół dr hab. Małgorzaty Daczewskiej prof. nadzw. UWr.

Małe białka szoku cieplnego należą do białek opiekuńczych, które chronią komórki organizmów prokariotycznych i eukariotycznych przed szkodliwymi skutkami stresu. sHsps zapobiegają indukowanej przez stres, nieodwracalnej agregacji uszkodzonych białek i umożliwiają renaturację związanych substratów. Mutacje w genach kodujących małe białka szoku cieplnego mogą prowadzić do rozwoju chorób nerwowo-mięśniowych, w przebiegu których sHsps są często składnikiem agregatów białkowych.

W przedstawionej do recenzji rozprawie, Doktorantka postawiła przed sobą ambitne zadanie przeprowadzenia badań molekularnych mających na celu analizę funkcjonalną małego





białka szoku cieplnego Hsp67Bc, najbliższego funkcjonalnego ortologa białka HSPB8 występującego u człowieka, w rozwoju zarodkowym oraz w stadiach larwalnych muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Wykorzystanie w badaniach muszki owocowej – gatunku modelowego funkcjonującego w badaniach od czasu wybitnych dla genetyki prac Thomasa Morgana z początku XX wieku daje szeroką perspektywę badawczą o znaczeniu nie tylko opisowym, ale i funkcjonalnym, co pozwoli uzupełnić naszą wiedzę na temat funkcji małych białek szoku cieplnego.

Manuskrypt rozprawy doktorskiej liczy 80 stron i zawiera typowe dla pracy naukowej rozdziały: Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografia. W tekście umieszczone są 22 ryciny i 5 tabel. Wstęp pracy poprzedzony jest wykazem dorobku naukowego Doktorantki oraz wykazem najczęściej stosowanych skrótów.

We **wstępie** rozprawy, Doktorantka przedstawiła informacje na temat białek szoku cieplnego (**H**eat **S**hock **P**roteins, Hsps). Opisała budowę, aktywność i funkcje małych białek szoku cieplnego (**s**mall **H**eat **S**hock **P**roteins, sHsps) oraz zespoły patologiczne wywołane mutacjami w genach tych białek, a także scharakteryzowała występujące u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, białko Hsp67Bc, które jest funkcjonalnym ortologiem białka HSPB8 występującego u człowieka. Osobna część wstępu poświęcona jest rozwojowi zarodkowemu muszki owocowej, morfogenezie mięśni somatycznych, strukturze włókna mięśniowego oraz połączeniom nerwowo-mięśniowym badanego gatunku. We wstępie Doktorantka zamieściła 5 schematów, które dobrze ilustrują działanie małych białek szoku cieplnego w komórkach zwierzęcych (Rys.1), główne etapy rozwoju zarodkowego muszki owocowej (Rys.2), morfogenezę mięśni szkieletowych zarodków oraz osobników dorosłych *Drosophila melanogaster* (Rys.3), strukturę sarkomeru (Rys.4) oraz unerwienie mięśni somatycznych larw muszki owocowej (Rys.5). W rozdziale tym na podkreślenie zasługuje obszerny przegląd badań nad obecnością i funkcjami małych białek szoku cieplnego u zwierząt laboratoryjnych i człowieka, który został przygotowany na podstawie prac przeglądowych i eksperymentalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach w ostatniej dekadzie. Taki sposób podjęcia tematu już we wstępie wskazuje na ważność podjętych badań i świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do ich realizacji.





Z obowiązku recenzenta jestem jednak zobligowana zwrócić uwagę na fakt że we wstępie Doktorantka stosuje szereg skrótów myślowych, co może w dobie krótkich wiadomości tekstowych jest pożądane, ale w opracowaniach naukowych nie powinno mieć miejsca, gdyż może być przyczyną niezamierzonych błędów merytorycznych i nieścisłości. Przykładowo, moje wątpliwości budzi opis struktury domeny α -krystalinowej małych białek szoku cieplnego, zwłaszcza, że w publikacji, której Doktorantka jest współautorem (Dubińska-Magiera i wsp., 2014, *Febs Letters*, 588:517-530), podobnie, jak we wcześniejszych pracach (Van Montfort i wsp., 2001, *Adv Protein Chem.* 59:105-56., Van Montfort i wsp., 2001a, *Nat.Struct.Biol.* 8:1025-30 ; Baranova i wsp., 2011, *J. Mol. Biol.*, 411:110-122) struktura tej domeny została opisana precyzyjnie. Nie bardzo rozumiem, dlaczego w opisie struktury domeny α -krystalinowej sHsps Doktorantka powołuje się na pracę (Baranova i wsp., 2009, *Acta Cryst*, 65:1277-1281), w której struktura ta nie została opisana, a jej autorzy odnoszą się jedynie do wcześniejszych prac (Kim i wsp., 1998 *Nature*, 394:595-599; Van Montfort i wsp., 2001). Ponadto trudno mi sobie wyobrazić, w jaki sposób „Zwiększanie długości mięśni możliwe jest dzięki sukcesywnemu dobudowywaniu kolejnych sarkomerów w krańcowych częściach komórki w pobliżu ich przyczepów”, zwłaszcza, że w cytowanej pracy (Schulman i wsp., 2015, *Rev Dev Biol*, 4:313-34.) mechanizm ten jest precyzyjnie opisany. Mam nadzieję, że w czasie obrony Doktorantka rozwieje moje wątpliwości w podniesionych wyżej kwestiach.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej zostały dobrze zaplanowane, a ich cele zostały sformułowane jako trzy zadania badawcze, dotyczące: poznania lokalizacji białka Hsp67Bc w warunkach normalnych, analizy efektu wprowadzenia mutacji białka Hsp67Bc w pozycji R126 oraz analizy efektu wyciszenia genu *Hsp67Bc* w tkance nerwowej i mięśniowej.

Wprawdzie cele rozprawy doktorskiej nie budzą żadnych zastrzeżeń, ale we wprowadzeniu do tego rozdziału brakuje mi hipotez badawczych. Mam świadomość, że stawianie hipotez w badaniach opisowych nie jest obligatoryjne, ale w kontekście badań prowadzących do wniosków o charakterze porównawczym (porównanie skutków mutacji Hsp67Bc^{126E} i Hsp67Bc^{126N} w mięśniach szkieletowych i w płytkach motorycznych) postawienie hipotez byłoby ciekawym elementem rozprawy wzbogacającym jej układ.

Do realizacji celów pracy Doktorantka wykorzystała linie dzikie *D. melanogaster* oraz precyzyjnie przygotowane mutanty, a metody badawcze obejmujące mikroskopię świetlną





(konfokalną fluorescencyjną) i elektronową (transmisyjną), metody molekularne typu PCR i Western blot oraz metody immunocytochemiczne, a także testy behawioralne i pomiary morfometryczne dobrała adekwatnie do zaplanowanych zamierzeń. Rola recenzenta obliguje mnie do zwrócenia uwagi, że rozdział **Materiały i metody** zawiera wiele szczegółów, aczkolwiek napisany jest chaotycznie, co w znacznym stopniu utrudnia jego analizę merytoryczną. Rozdział ten zawiera wiele nieścisłości i braków. W rozdziale tym szczególnie brakuje mi informacji na temat sposobu określania wieku zarodków badanego gatunku, precyzyjnego określenia wieku „późnych” zarodków, liczby osobników (zarodków i larw) użytych do badań z wykorzystaniem technik mikroskopii świetlnej i elektronowej. Moje zastrzeżenia budzi także podrozdział 3.18., w którym Doktorantka opisuje procedury stosowane w mikroskopii elektronowej. Chciałabym się dowiedzieć: 1. jakie było stężenie buforu fosforanowego i jego pH, 2. jaki konkretnie żelazicyjanek użyty był do sporządzenia mieszaniny, 3. jakie było stężenie roztworów żelazicyjanku oraz czterotlenku osmu użytych do sporządzenia mieszaniny? Ponadto intryguje mnie: 1. w jakim celu po utrwaleniu tkanki do mikroskopii elektronowej „inkubuje” się przez 24 w buforze fosforanowym, 2. czemu służy „inkubacja” utrwalonych i wypłukanych tkanek „w mieszaninie żelazicyjanek-tlenek osmu, sporządzonej w proporcji 1:1” i czy to aby na pewno jest inkubacja, 3. w jaki sposób można w transmisyjnym mikroskopie elektronowym oglądać i fotografować materiał zatopiony w bloczkach. Szkoda, że przygotowując tę część metodyki doktorantka nie skorzystała z prac metodycznych, dotyczących utrwalania materiału do mikroskopii elektronowej (McDonald, 1984, *J. Ultrastruct. Res.*, 86: 107-118), czy też innych prac opisujących te techniki (Jędrzejowska i wsp., 2014, *Arthropod Struct Dev* 43: 361-370) Ponadto, chciałabym się także dowiedzieć, co dokładnie w testach behawioralnych oznacza stwierdzenie, że „pomiar powtórzono 3-krotnie na grupie 15 osobników”. Czy każda z badanych grup zawierała 15 osobników, czy pomiar wykonano w sumie na 15 osobnikach (wtedy brak informacji ile osobników zawierała każda z badanych grup)? W podrozdziale 3.22. zabrakło mi informacji jakie dane poddano analizie statystycznej. Ponadto, interesuje mnie także, jakie przesłanki przemawiają za tym, że do analizy statystycznej wybrano testy parametryczne (Test t-studenta i ANOVA), ponieważ nie znalazłam tych informacji w wymienionym powyżej podrozdziale.





W rozdziale **Wyniki** Doktorantka opisuje uzyskane wyniki, które ilustruje fotografiami uzyskanymi w mikroskopie konfokalnym i elektronowym oraz wykresami. Lektura tego rozdziału pokazuje ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę do realizacji zamierzonych celów. Jednak, wydaje mi się, że dwa pierwsze podrozdziały (4.1. i 4.2) tej części rozprawy powinny się znaleźć w rozdziale trzecim - Materiały i Metody, ponieważ dotyczą odpowiednio: uzyskania przeciwciała poliklonalnego oraz konstrukcji linii UAS-Venus:Hsp67Bc.

Właściwy rozdział Wyniki rozpoczyna się dopiero w podrozdziale 4.3, w którym Doktorantka opisuje ekspresję białka Hsp67Bc w liniach dzikich badanego gatunku. Z lektury tego podrozdziału dowiadujemy się, że w układzie nerwowym zarodków muszki owocowej ekspresja badanego białka lokuje się w mózgu, wypustkach nerwowych oraz w nerwach opuszczających łańcuszek brzuszny. Natomiast w mięśniach somatycznych larw badanego gatunku białko Hsp67Bc agreguje się w sarkoplazmie, wokół jądra komórkowego oraz w prążkach A oraz liniach Z sarkomerów, a także w sąsiedztwie płytek motorycznych. Analiza mutantów wykazała, że białko Venus-Hsp67Bc^{R126E} gromadzi się podobnie, jak białka Hsp67Bc i Venus-Hsp67Bc w liniach Z i prążkach A sarkomerów, a ekspresja Hsp67Bc^{R126E} w mięśniach wywołuje miejscowe zaburzenia prawidłowego ich wzoru, co przejawia się przerwaniem ciągłości linii Z. Natomiast białko Venus-Hsp67Bc^{R126N} gromadzi się w sąsiedztwie płytek motorycznych i nie jest obecne w jądrze komórkowym, ani też wokół niego. Obserwacje zawarte w tych podrozdziałach są interesujące, natomiast należy ubolewać, że Doktorantka nie dołożyła wystarczającej staranności do precyzyjnego opisanie rycin obrazujących wyniki uzyskane w mikroskopie konfokalnym. We wszystkich opisach brakuje powiększeń oraz trudno jest znaleźć precyzyjne opisy analizowanych struktur.

Dokumentacja pokazana w części opisującej ultrastrukturę mięśni budzi moje zastrzeżenia. Elektronogramy są mało czytelne i trudno określić, czy jest to wynikiem słabego utrwalenia materiału, czy też zastosowania zbyt małych powiększeń. Wydaje mi się, że na podstawie takiej dokumentacji trudno jest wnioskować, czy struktura mitochondriów uszkodzona jest w wyniku mutacji, czy też w wyniku słabego utrwalenia materiału. Mam świadomość, że zarodkowe i larwalne tkanki utrwalają się trudno, a pierwszymi oznakami słabego utrwalenia są właśnie zmiany w ultrastrukturze mitochondriów. Analizując elektrony zamieszczone w pracy mam wątpliwości co





do powiększeń. Ponadto, wstawki umieszczone na rycinach 14A, 14E oraz 16D wydają się nie być powiększonymi fragmentami zamieszczonych rycin.

W celu określenia wpływu zaobserwowanych zmian morfologicznych i ultrastrukturalnych na funkcję mięśni, Doktorantka przeprowadziła testy behawioralne, wyznaczyła współczynnik kurczliwości mięśni oraz wykonała dodatkowe barwienie odczynnikiem Mitotracker Red. Test pełzania wykazał, że grupą o zmniejszonej ruchliwości są larwy wykazujące w mięśniach ekspresję białka Venus-Hsp67Bc^{R126E}, natomiast test odwracania nie wykazał istotnych statystycznie różnic między badanymi genotypami. Natomiast, wyznaczony współczynnik kurczliwości mięśni ujawnił, że najbardziej afektowaną grupą są larwy wykazujące w mięśniach ekspresję Venus-Hsp67Bc^{R126E}. Ponadto, badania długości skurczonych i rozluźnionych mięśni VL4 wykazały, że mimo istotnych zmian w morfologii i funkcji, długość mięśni mutantów nie odbiegała od wartości wyznaczonej dla typu dzikiego w żadnej z badanych grup. W podrozdziałach opisujących tę część badań brakuje mi wyników testów statystycznych. Podano jedynie wykresy obrazujące zróżnicowanie badanych grup. Barwienie z zastosowaniem odczynnika Mitotracker Red wykazało obniżoną intensywność sygnału w mięśniach larw z ekspresją Venus-Hsp67Bc^{R126E}, co wskazuje to na obniżenie potencjału błonowego mitochondriów i potwierdza istotny wpływ tej mutacji na działanie mitochondriów i w konsekwencji metabolizm tlenowy mięśni.

Uzyskane wyniki badań morfologicznych sprawiły, że Doktorantka zdecydowała się także przeanalizować i ocenić wpływ modyfikowanych form Hsp67Bc na morfologię płytek motorycznych u larw wykazujących ekspresję różnych form zmodyfikowanego białka Hsp67Bc. Uzyskane wyniki sugerują, że obie wprowadzone mutacje mają wpływ na liczbę kolbek synaptycznych w obrębie pojedynczej płytki motorycznej, ale wykazują efekt przeciwny. U larw z ekspresją Venus-Hsp67BcR^{126E} wpływają na zmniejszenie liczby kolbek synaptycznych, natomiast u larw z mutacją Hsp67BcR^{126N} zwiększają ich liczbę. W podrozdziałach opisujących tę część badań, podobnie jak w poprzednim, brakuje mi wyników testów statystycznych. Podano jedynie wykresy obrazujące zróżnicowanie badanych grup oraz określenia liczby osobników wykorzystanych do tych badań.

Obecność białka Hsp67Bc w okolicach płytek motorycznych oraz w nerwach, a także zmieniona morfologia tych struktur u larw wykazujących ekspresję zmutowanych form badanego





białka sprawiły, że Doktorantka zbadała wpływ wyciszenia ekspresji genu *Hsp67Bc* na morfologię płytek motorycznych. Badania te wykazały, że mięśniowe wyciszenie *Hsp67Bc* spowodowało istotny wzrost liczby kolbek synaptycznych i rozgałęzień w płytkach motorycznych oraz zwiększenie średnicy kolbek synaptycznych względem kontroli. W podrozdziałach opisujących tę część badań, podobnie jak w poprzednim, brakuje mi wyników testów statystycznych. Podano jedynie wykresy obrazujące zróżnicowanie badanych grup oraz określenia liczby osobników wykorzystanych do tych badań.

Ubolewam, że reprezentatywne zdjęcia obrazujące zaobserwowane zmiany, a zamieszczone na rycinach 20 i 21 nie zostały odpowiednio opisane.

W ostatnim etapie swoich badań, Doktorantka przeanalizowała wpływ wzmocnienia wyciszenia genu *Hsp67Bc* w układzie nerwowym, a badania te prowadzone były u zarodków. Wyniki tych badań wykazały, że ponad połowa zarodków (57%) rozwijała się prawidłowo, a pozostałe uszkodzone były w stopniu lekkim (10%), umiarkowanym (12%) oraz znacznym (21%). W tekście tego podrozdziału udział zmian zachodzących w rozwoju zarodków podana jest w procentach, natomiast w diagramie podane są liczby, które prawdopodobnie przedstawiają liczbę osobników.

Podsumowując rozdział Wyniki muszę stwierdzić, że zbyt mało w nim narracji a zbyt dużo, komentarzy, które powinny zostać przeniesione do rozdziału Dyskusja.

Doktorantka oceniła zaprezentowane przez siebie wyniki w krótkiej 6-stronicowej dyskusji konfrontując je z dobrze dobranym piśmiennictwem, wskazując jednocześnie zagadnienia, które powinny być przedmiotem dalszych badań. Myślę, że przeniesienie licznych komentarzy do uzyskanych wyników zawartych we wszystkich podrozdziałach Wyników znacznie wzbogaciłoby dyskusję. Z obowiązku recenzenta muszę wskazać, że w dyskusji znajdują się liczne literówki, skróty myślowe i kalki z języka angielskiego, które sprawiają, że zdania tej części opracowania stają się niegramatyczne i niestylizyczne.

Po zakończeniu dyskusji, Doktorantka formułuje 4 wnioski, które bezpośrednio wynikają z przeprowadzonych przez nią badań. Ponadto na podkreślenie zasługuje fakt, że streszczenia pracy, zarówno w języku polskim jak i angielskim napisane są poprawnie i dobrze podsumowują wszystkie jej części.

Literatura wykorzystana do przygotowania pracy, obejmująca 122 pozycje, jest dobrze dobrana, aczkolwiek źle cytowana. Doktorantka zapomniała o zasadach cytowania literatury i





niezależnie od ilości autorów cytowanych prac we wszystkich przypadkach wymienia jedynie pierwszego z nich. Ponadto nazwiska niektórych autorów cytowane są błędnie, przykładowo Baranowa, zamiast Baranova; Delberę zamiast Delbecq; Jacob zamiast Jakob; itd. Dwie pozycje cytowane w tekście nie znalazły się w spisie literatury (Fuchs i wsp., 2010; Martorell-Riera 2014), a jedna wskazana w spisie literatury nie znalazła się w tekście (Muñoz i wsp., 2013).

Po przestudiowaniu całości dysertacji pragnę podkreślić, że uwagi i pytania skierowane do Doktorantki w żadnym stopniu nie obniżają wysokiej wartości przedstawionej do recenzji pracy. Mam świadomość, że w tak obszernym i wieloaspektowym opracowaniu trudno ustrzec się błędów i liczę na owocną dyskusję w trakcie obrony rozprawy doktorskiej, która mam nadzieję, rozwieje wszystkie moje wątpliwości. Z całą stanowczością stwierdzam, że praca mgr Jadwigi Jabłońskiej wnosi nowe cenne dane do nauki, dotyczące charakterystyki białka Hsp67Bc i wpływu jego zmodyfikowanych wariantów na funkcję mięśni somatycznych larw stadium *D. melanogaster* oraz stanowi ważny przyczynek do dalszych badań tych zagadnień zwłaszcza w kontekście patogenezy chorób neurodegeneracyjnych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona od oceny rozprawa doktorska mgr Jadwigi Jabłońskiej jest oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego i dowodzi jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, spełniając tym samym 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. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Jadwigi **Jabłońskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Weronika Rupik

