



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych  
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 8 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. UW  
z Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego

Przedstawiona mi do recenzji praca mgr Jadwigi Jabłońskiej mieści się w nurcie badań nad poznaniem mechanizmów patogenezы chorób nerwowo-mięśniowych. Jej badania dotyczą poznania roli małego białka szoku cieplnego, Hsp67Bc, w rozwoju układu nerwowego i mięśni poprzecznie-prążkowanych u *Drosophila melanogaster*. Jest to zagadnienie o tyle istotne, że mutacje w ludzkim ortologu, białku HSPB8 (oraz innych białkach z tej rodziny), są związane z miopatiami i neuropatiami. Doktorantka wykorzystując *D. melanogaster* jako model do badania procesu miogenezy i neurogenezy, wykazała że podobnie jak u ludzi białko to pełni istotną rolę w organizacji i działaniu mięśni oraz układu nerwowego. Ponadto, dzięki nadprodukcji w sposób tkankowo-zależny zmutowanego białka (w pozycji odpowiadającej mutacjom zidentyfikowanym u pacjentów) była w stanie prześledzić wpływ mutacji na rozwój embrionów oraz na morfologię mięśni, złącza nerwowo-mięśniowego i układu nerwowego. Jej badania wnoszą istotny wkład w zrozumienie etiopatogenezy chorób nerwowo-mięśniowych.

### Formalny opis rozprawy

Licząca 80 stron (wliczając w to stronę tytułową i strony nie będące bezpośrednio związane z rozprawą) dysertacja posiada w zasadzie układ typowy dla rozpraw doktorskich. Część merytoryczna rozpoczyna się opisem dorobku naukowego Doktorantki, spisem treści oraz wykazem najczęściej stosowanych skrótów. Wstęp liczy 15 stron i zawiera pięć rycin. Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy następuje liczący 11 stron rozdział Materiały i metody, w którym są cztery tabele i jedna rycina. Wyniki liczą 21 stron i zawierają 16 złożonych rycin. Na Dyskusję składa się nieco ponad 5 stron (w tym jedna tabela); w zasadzie w ramach Dyskusji zostały umieszczone Wnioski. Streszczenia w języku polskim i angielskim liczą po niecałe 2 strony. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa, na które składają się 122 pozycje, z czego ponad połowa to prace z ostatniej dekady. Doktorantka przyjęła dość nietypowy, acz nieprawidłowy sposób cytowania literatury, podając obok roku opublikowania artykułu jedynie nazwisko pierwszego autora.

### Ocena merytoryczna

W **Spisie treści** zauważyłam kilka drobnych nieprawidłowości, np. występujące w nazwie rozdziałów skróty oraz anglojęzyczne naleciałości, np. primery zamiast starterów lub korespondują

(z fenotypami) zamiast odpowiadają (fenotypom). Wykaz skrótów jest krótki, podane nazwy są w zasadzie prawidłowe, z wyjątkiem GFAP, gdzie na końcu polskiej nazwy zabrakło gkleju.

**Wstęp** jest wprowadzeniem w tematykę prowadzonych badań; w pierwszej części Doktorantka opisuje białka szoku cieplnego, skupiając się na budowie i funkcjach małych białek szoku cieplnego (sHSPs) oraz związanych z tymi białkami patologiami. Drugą część to opis rozwoju *Drosophila melanogaster*, ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju i budowy mięśni poprzecznie-prążkowanych. Wstęp zawiera pięć rycin, myślę iż przydałby się jeszcze schemat prezentujący strukturę krystaliczną badanego białka Hsp67Bc (lub jego odpowiednika u kręgowców, HSPB8), a zwłaszcza rejonu, w którym znaleziono mutacje sprawcze w HSPB8. Niektóre ryciny są dobrej jakości - 1, 2 i 4, zaś dwie pozostałe są niestety mało czytelne. Zastanawiam się, dlaczego w erze programów graficznych Doktorantka nie postarała się o to, aby na rycinach były nazewnictwo polskie. Zbyt lakoniczne są też opisy pod rycinami. Nie mogę napisać, że tę część rozprawy czytało się z przyjemnością. Liczne literówki i kalki z języka angielskiego (nawet w konstrukcji zdania) oraz całkowite zlekceważenie zasad interpunkcji znacznie utrudniało lekturę tej (i pozostałych) części dysertacji. Znalazłam też kilka błędów merytorycznych. Błędnie została opisana budowa miozyny - co to jest miozyna ciężka i miozyna lekka? Zajmuję się miozyną ponad trzy dekady i nie znam takich białek. Mniemam iż Doktorantce chodziło o to, że cząsteczka miozyny mięśniowej zawiera dwa łańcuchy ciężkie oraz związane z nimi cztery łańcuchy lekkie (po dwa na jeden łańcuch ciężki). Ciekawa jestem, czy Doktorantka jest świadoma obecności w mięśniach innych typów miozyn; chętnie o tym podyskutuję w czasie obrony rozprawy. Mam nadzieję, że Doktorantka wie iż ekspresji ulegają geny, a białka są syntetyzowane; pojęcie ekspresjonowania białka przewija się bowiem w toku całej rozprawy. Ponadto, zbyt żargonowo została opisana budowa domeny krystalinowej, liczę że zostanie to poprawnie przedstawione podczas obrony.

**Celem** pracy było poznanie wpływu mutacji w genie *Hsp67Bc*, odpowiadających znanym mutacjom sprawczym w jego odpowiedniku u ludzi, oraz wyciszenia tego genu na budowę i funkcje mięśni oraz złącza nerwowo-mięśniowego (NMJ). Jednym z zamierzeń było również potwierdzenie przydatności systemu *Drosophila* w badaniu mechanizmów patogenezы mięśni i układu nerwowego. Doktorantka nie wyartykułowała jednak w tej części rozprawy związku reszty Lys-141 w białku ludzkim HSPB8 z resztą Arg-126 w jego ortologu u *Drosophila*; dowiadujemy się tego dopiero podczas dalszej lektury. Zastanawiam się również, dlaczego jako celi szczegółowych Doktorantka nie wymienia otrzymania specyficznego przeciwciała skierowanego przeciw rejonowi na końcu karboksylowym białka oraz konstrukcji linii *Drosophila* umożliwiających tkankowo-specyficzną ekspresję genów. To przecież ważne zadania, bez tych narzędzi nie byłaby możliwa dalsza praca.

Doktorantce z sukcesem udało się zrealizować postawione sobie cele, a do ich realizacji wykorzystwała szeroki wachlarz technik biologii molekularnej i komórkowej, genetycznych oraz mikroskopię fluorescencyjną i elektronową, a także analizy behawioralne larw *Drosophila*. Metody te zostały dość poprawnie opisane w **Materiałach i metodach**. W czterech tabelach wymieniono użyte startery, przeciwciała (wraz z ich pochodzeniem i zastosowanymi rozcieńczeniami), a także opis systemu GAL4/UAS i badane krzyżówki szczepów zawierających sekwencje GAL4 pod stosownymi dla badanych tkanek promotorami. Mam kilka uwag do tej części rozprawy. Nie podoba mi się pisanie medium w miejsce pożywek (podłoży) hodowlanych; zastanawiam się też, czy Doktorantka nie pomyliła się w stężeniu SDS (0,001% na stronie 32); to chyba o dwa rzędy wielkości mniej niż się zwyczajowo stosuje. Brakuje mi również informacji o płytkach agarowych, na których hodowano embriony, pożywkach kukurydziano-sojowych oraz o siatkach stosowanych

do przepłukiwania embrionów. Myślę też, że należałoby napisać o tym, jak zbierano obrazy w mikroskopie konfokalnym (długość fali, obiektywy, itp.), zwłaszcza, że nie ma tych informacji (a czasem i skali) przy opisie rycin w Wynikach.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka przedstawia uzyskane przez siebie rezultaty; moim zdaniem robi to dość nieporadnie, często myląc opis wyniku z jego interpretacją. Brakuje też choćby krótkiego wprowadzenia do każdego z podrozdziałów, nie ma też podsumowania poszczególnych części. Utrudnia to zrozumienie pracy, nie mówiąc o tym, że i same ryciny nie są najlepiej opisane i wykonane. Np. przy wykresach nie ma oznaczenia osi rzędnych, nie ma podanych wielkości standardów mas przy niemal wszystkich żelach i immunoblotach, a niektóre ryciny są słabej rozdzielczości. Tu muszę przyznać, że Doktorantka zdaje sobie sprawę z tego problemu, bo dostarczono mi pliki z obrazami o większej rozdzielczości. Wydaje mi się, że bardziej zasadne byłoby chyba opisanie tego, co znajduje się na mikrografach, a dopiero potem przedstawienie analizy ilościowej, a nie odwrotnie (jak ma to np. miejsce w przypadku rycin 19-22). Niewygodne dla czytelnika jest umieszczanie opisów rycin na sąsiednich stronach, jak i ich dzielenie na kolejne strony.

Mimo tak słabej strony edytorskiej tej części rozprawy stwierdzam, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki są imponujące, wskazują na ogrom pracy, jaki włożyła w ich uzyskanie. Zostały wykonane niezbędne kontrole, a tam gdzie to niezbędne została przeprowadzona analiza statystyczna. Doktorantka rozpoczęła badania od otrzymania przeciwciała skierowanego przeciw karboksylowej (nie C-końcowej!) części Hsp67Bc; antygenem był fragment białka zawierający 40 reszt aminokwasowych z końca karboksylowego białka, który Doktorantka samodzielnie uzyskała. Przeciwciało to posłużyło do analizy poziomu białka Hsp67Bc w lizatach tkanek dorosłych muszek i larw *Drosophila*. Uzyskane wyniki wskazują, na dużą zawartość tego białka w larwach 3. stadium i ich mózgach. Mam tu pytanie odnośnie ryciny 10A - czym jest prążek o masie jak szacuję ok. 70 kDa, widoczny w obu badanych próbkach. Stosując inne, już wcześniej opisane w literaturze przeciwciało (skierowane na 17 reszt aminokwasowych na końcu karboksylowym białka; tu przy okazji - dlaczego nie użyła "swojego" przeciwciała) Doktorantka wykazała, że Hsp67Bc w układzie nerwowym znajduje się w mózgu i w części obwodowej, zaś w mięśniach występuje w linii Z i prążku A oraz w sąsiedztwie złącza nerwowo-mięśniowego i w rejonie perinuklearnym.

Następnie Doktorantka przystąpiła do analizy fenotypów muszek, do których wprowadzono przygotowane przez nią specyficzne tkankowo konstrukty zawierające cDNA Hsp67Bc i jego mutanty z podstawieniami w reszcie Arg-126 (R/E i R/N) w fuzji z GFP. Nadprodukcja mutantu R/E następowała w tych samych przedziałach włókna mięśniowego, co białko endogenne, przy czym GFP-Hsp67Bc występowało również w jądrze komórkowym. Doktorantka zauważyła zmiany w strukturze linii Z, która wydawała się być przerywana. Tę obserwację potwierdziła w mikroskopie elektronowym, który uwidoczniał również nieprawidłowości w mitochondriach (dodatkowo potwierdzono to barwieniem za pomocą MitoTrackera) oraz nagromadzenie się ziaren glikogenu. Podobne analizy wykonała również dla mutantu R/N. Zaobserwowała, że we włóknie białko to gromadzi się w postaci agregatów, widocznych również w okolicy NMJ i w jądrze włókna. Co więcej, dochodzi do zaniku prążkowania na znacznej powierzchni włókna, co wskazuje na znaczne zaburzenia w strukturze mięśni. Zostało to potwierdzone przy użyciu mikroskopii elektronowej, widoczne były bowiem otoczone błoną agregaty - amorficzne lub z elektrono-gęstymi ziarnistościami. Nie zaobserwowano natomiast znaczących zmian w strukturze mitochondriów (ani ich funkcji - barwienie za pomocą MitoTrackera) ani zwiększenia ilości ziaren glikogenu. Doktorantka wykonała następnie analizy behawioralne larw 3. stadium i wykazała, że larwy

nadprodukujące mutantu R/E wykazują upośledzenie w teście pełzania i upośledzenie w kurczliwości mięśni, nie zaobserwowano tych zmian w przypadku nadprodukcji mutantu R/N. Trochę mnie to dziwi, zważywszy na dużo większe zmiany w strukturze włókna mięśniowego w przypadku mutantu R/N.

Ponieważ zarówno Hsp67Bc typu dzikiego, jak i jego mutanty lokalizowały się w sąsiedztwie NMJ, Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy zmutowane białka wpływają na budowę złącza. Analizy morfologiczne wykazały, że jedynym parametrem, który uległ zmianie była liczba kolbek synaptycznych. O ile mutant R/E powodował ich spadek, to mutant R/N powodował ich wzrost, przy czym w przypadku mutantu R/N widoczny był brak wyraźnych granic pomiędzy kolbkami, co wskazuje na możliwe zaburzenia w ich strukturze i funkcji. Zastanawia mnie, dlaczego do wybarwienia złącza Doktorantka nie użyła  $\alpha$ -bungarotoksyny, która bezpośrednio wiąże się z obecnymi w części postsynaptycznej złącza receptorami acetylocholinowymi i w fuzji ze znacznikiem fluorescencyjnym jest powszechnie stosowana do wizualizacji złącza u kręgowców.

W kolejnej, ostatniej części Wyników Doktorantka opisuje wpływ tkankowo-specyficznego wyciszenia ekspresji *Hsp67Bc* na morfologię mięśni i złącza NMJ oraz na rozwój embrionów. Wykazała, że wyciszenie mięśniowo- i nerwowo-specyficzne nie wpływało na morfologię włókien mięśniowych, natomiast oba rodzaje wyciszenia powodowały zwiększenie liczby kolbek synaptycznych i powstanie większej liczby rozgałęzień w strukturze złącza. Wyciszenie nerwowo-specyficzne powodowało również zmniejszenie średnicy kolbek. Doktorantka wykazała również, że wyciszenie nerwowo-specyficzne wpływało na rozwój embrionów *Drosophila*, gdyż niemal połowa embrionów miała mniej lub bardziej widoczne zaburzenia rozwojowe, przy czym ok. 20% miało poważne zaburzenia w rozwoju układu nerwowego i mięśni.

W liczącej liczy nieco więcej niż pięć stron **Dyskusji** Doktorantka zwięźle omawia swoje wyniki w oparciu o doniesienia innych badaczy. Pozytywnie oceniam pomysł przedstawienia tabeli podsumowującej wpływ nadprodukcji badanych mutantów *Hsp67Bc*, ale może warto byłoby dodać tu jeszcze informacje o wpływie obniżenia syntezy tego białka. Dyskusja kończy się podrozdziałem perspektywy, w którym Doktorantka wskazuje plan przyszłych badań, które powinny poszerzyć wiedzę o roli badanego przez nią białka w układzie nerwowo-mięśniowym. Świadczy to o jej niewątpliwym zaangażowaniu w tematykę prowadzonych badań.

Rozprawę kończą **Wnioski**, które są raczej zwięzłym (w postaci czterech punktów) podsumowaniem uzyskanych wyników niż rzeczywistymi wnioskami. Elementów wniosków można dopatrzeć się w ostatnich członach punktów 2, 3 i 4. Sądzę, że ta część rozprawy powinna nosić tytuł "Posumowanie i wnioski".

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca jest zredagowana w niezbyt staranny sposób - jak już wcześniej wspomniałam część rycin była mało czytelna i skąpo opisana, w tekście zauważyłam sporo literówek, żargonu laboratoryjnego oraz kalek z języka angielskiego. Pozwolę sobie wskazać te najbardziej rażące błędy. N-koniec, czyli koniec aminowy łańcucha polipeptydowego to kalka z N-terminus; swoim podopiecznym radzę, aby przy pierwszym użyciu tego zwrotu napisali go w nawiasie, obok poprawnej nazwy, a potem już stosowali tę skróconą formę. Wspomniałam już wcześniej o korespondującym fenotypie czy primerach, ale najbardziej zadziwiło mnie określenie "afektowane" w znaczeniu, że w czymś widoczny był najsilniejszy efekt. Wolę też - zachowane w toku ewolucji zamiast konserwowane w ewolucji; oddziaływania zamiast interakcji; podstawienie zamiast substytucji. Wydaje mi się, również że cDNA namnaża się w próbówce, a nie w PCR.. *Step* w

języku angielskim oznacza nie tylko krok, ale również etap. Stąd poprawniej byłoby chyba pisanie o następnych etapach, a nie krokach w przypadku wykonywania doświadczeń. Te liczne uwagi umieszczam w celu edukacyjnym, głównie z myślą o dalszej pracy naukowej (i dydaktycznej) Doktorantki.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pani mgr Jadwigi Jabłońskiej ma dużą wartość poznawczą i wzbogaca wiedzę o udziale białek szoku cieplnego w rozwoju mięśni poprzecznie-prążkowanych i układu nerwowego u *Drosophila melanogaster*. Jej badania potwierdziły również, że model owadzi można z powodzeniem stosować w badaniach nad patogenezą chorób układu nerwowego i mięśni u ludzi. Rozwiązanie postawionych sobie zadań badawczych Doktorantka osiągnęła poprzez realizację wielu logicznie zaplanowanych i dobrze wykonanych doświadczeń, uzyskanych z wykorzystaniem szeregu nowoczesnych techniki badawczych. Otrzymane wyniki są nowatorskie i stanowią zacznik do dalszych badań. Z informacji uzyskanych od promotora rozprawy wynika, że materiał składający się na rozprawę został wysłany do prestiżowego czasopisma *Cellular and Molecular Life Sciences* i ma duże szanse na opublikowanie, gdyż autorzy zostali poproszeni o wykonanie dodatkowych doświadczeń. Doktorantka jest tu pierwszym autorem. Ponadto, jest ona współautorem jednego artykułu doświadczalnego (w *Development*) i jednego przeglądowego (w *FEBS Letters*). Moim zdaniem Doktorantka wydaje się być dobrze przygotowana do pracy badawczej, powinna jednak pogłębić umiejętność opisywania uzyskanych wyników, co jest przecież niezbędne dla rozwoju jej kariery naukowej i przekazywania innym swojej wiedzy...

Rolą recenzenta jest przede wszystkim rzetelna ocena rozprawy, stąd tak duża liczba uwag i komentarzy krytycznych, ale chciałabym podkreślić, że nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny rozprawy jako całości. Szkoda jednak, że Doktorantka nie poświęciła więcej czasu i uwagi na przygotowanie rozprawy, bo to bardzo wzmocniłoby uzyskane przez nią dane. Mam też nadzieję, że Doktorantka ustosunkuje się do moich uwag merytorycznych podczas obrony rozprawy.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia 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 ze zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Jadwigi Jabłońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez nią stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.