

Prof. dr hab. inż. Roman Kujawa
Katedra Ichtiologii i Akwakultury,
Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 5, 10-957 Olsztyn
Tel. 89 523 3436, 606 273 990
e-mail: reofish@uwm.edu.pl

Olsztyn, 23.10.2024

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Eweliny Posyniak

„Lokalizacja i funkcje małego białka szoku cieplnego HSPB8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*” wykonanej na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, w Zakładzie Biologii Rozwoju Zwierząt,

pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Daczewskiej

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały Nr 161/2003 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 6 lipca 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w przewodzie doktorskim Pani mgr Eweliny Posyniak.

1. Uwagi wstępne, zasadność wyboru tematu

Praca doktorska stanowi 85 stronicowe opracowanie wraz ze streszczeniem, tabelami, rysunkami i fotografiami. Wszystkie z wymienionych elementów stanowią jednolitą monografią analizowanego problemu badawczego. Oprócz tego, autorka załącza stosowną dokumentację uprawniającą ją do przeprowadzenia wszystkich niezbędnych do zrealizowania celu pracy zadań.

Podjęty przez doktorantkę temat zasługuje na szczególną uwagę. Pod względem naukowym jest on nowatorski i uzupełnia istotną lukę w lokalizacji i funkcji małego białka szoku cieplnego Hspb8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*. Białko szoku cieplnego Hspb8 należy do grupy białek opiekuńczych, które pełnią istotne funkcje w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Małe białka szoku cieplnego Hsps uczestniczą w tworzeniu odpowiedniej konformacji przestrzennej dla nowo syntetyzowanych białek w komórce. Wzrost ich obecności w komórkach obserwowany jest w warunkach stresu. Hspb8 wchodzi w interakcje z partnerami białkowymi i dlatego może brać udział w różnych procesach istotnych dla integralności i funkcjonowania tkanek. Małe białko szoku cieplnego Hspb8 kodowane jest przez gen *hspb8*. W przypadku mutacji punktowej w genie *hspb8* dochodzi do utraty integralności pomiędzy systemem nerwowym oraz mięśniowym, co końcowo prowadzi do dysfunkcji mięśni. Przypuszcza się, że mutacje w genie *hspb8* u ludzi mogą prowadzić do tzw. dystalnej dziedzicznej neuropatii ruchowej oraz choroby Charcota-Marie-

Tootha (CMT). W obu przypadkach molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych chorób nie zostały dobrze poznane.

Wybór tematu pracy doktorskiej pani Eweliny Posyniak uważam za właściwy, a postawiony problem jako konieczny do rozwiązania.

2. Merytoryczna ocena rozprawy

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce zawartej w przedstawionym opisie i publikacjach. Wstęp jest napisany w sposób zrozumiały dla czytelnika. Doktorantka bardzo jasno, krok po kroku wprowadza czytelnika w główny temat pracy, czyli funkcji małych białek szoku cieplnego. Czytelnik bardzo płynnie wprowadzony jest w temat pracy, mając jednocześnie pewność, że wszystkie użyte przez doktorantkę argumenty w pełni uzasadniają wybór tematu pracy. Najważniejszym argumentem przemawiającym za podjęciem się tego tematu jest znikoma liczba wyników badań określających przyczyny mutacji w genie *hspb8*. Rozdział ten napisany jest prawidłowo, a informacje przekazywane przez Doktorantkę są poparte danymi literaturowymi.

Niedociągnięcia jakie stwierdziłem w powyższym rozdziale

Na stronie 8 autorka użyła słowa „homostazy komórkowej” chyba chodziło o homeostazy komórkowej tak jak jest na str. 13?

Na stronie 18 autorka napisała „mięśnie dzielimy na dwie główne grupy: czerwone (wolne) oraz białe (szybkie) natomiast na stronie 51 „mięśnie szkieletowe *D. rerio* dzielą się na mięśnie wolne (białe) i szybkie (czerwone) – prosiłbym o wyjaśnienie, które stwierdzenie jest prawidłowe.

Na stronie 22 pojawia się określenie sztuczny fotoperiodyzm chyba chodziło o fotoperiod. Przy opisie warunków w jakich hodowane były danio pręgowane zabrakło informacji jaki był dodatek soli Ocean Instant (Aquarium Systems) do wody dejonizowanej.

Na stronie 23 „proces pozyskiwania materiału z dorosłych osobników *D. rerio* odbywał się zgodnie z wytycznymi i pozwoleniem Lokalnej Komisji Etycznej z wykorzystaniem anestetyka MS-222 (ang. *tricaine*) o stężeniu 0,5 g/L. – nie bójmy się napisać, że ryby zostały uśmiercone.

Na stronie 23 podany jest skład roztworu E3, w skład, którego wchodzi między innymi 0,1mM KCl a na stronie 24 ten sam roztwór składa się z 0.17mM KCl – gdzie jest błąd, i dlaczego w funkcji separatora dziesiętnego raz piszemy kropkę a raz przecinek?

Rozdział „*Cel pracy*” w bardzo klarowny sposób, odnosząc się do wstępu przedstawia, wręcz konieczność przeprowadzenia zaplanowanych prac, argumentując to brakiem dostatecznych informacji dotyczących pełnego profilu ekspresji genu *hspb8* oraz funkcji Hspb8 w mięśniach danio pręgowanego. Nieznana jest lokalizacja Hspb8 w poszczególnych tkankach ryby. Nie podjęto również próby poznania partnerów białkowych towarzyszących Hspb8. W celu wyjaśnienia nurtujących zagadnień, które przyczynią się lepszemu zrozumieniu molekularnych

podstaw chorób powodowanych mutacjami w genie *hspb8*, w pracy przeprowadzono liczne analizy, których celem było:

- zlokalizowanie transkryptu *hspb8* oraz analiza poziomu ekspresji *hspb8* w rozwoju zarodkowym *Danio rerio*,
- zlokalizowanie Hspb8 w tkance mięśniowej szkieletowej w rozwoju zarodkowym *D. rerio*.
- zlokalizowanie Hspb8 w wybranych organach dorosłego *D. rerio*,
- zbadanie interakcji pomiędzy Hspb8 *D. rerio* a potencjalnymi partnerami białkowymi.

W rozdziale „**Materiał i metody**” doktorantka w bardzo jasny i czytelny sposób opisuje wszystkie przeprowadzone analizy oraz wyjaśnia, dlaczego badania prowadziła na gatunku *Danio rerio*, który jest użytecznym modelem w badaniach chorób człowieka o podłożu genetycznym, w tym spowodowanych mutacjami w obrębie genu *hspb8*. Wspomniany rozdział to bardzo rozbudowany fragment pracy, w którym doktorantka w bardzo fachowy sposób opisuje wszelkie czynności związane z wykonaniem postawionego sobie celu. Autorka zrealizowała wszystkie eksperymenty w sposób umożliwiający ich powtórzenie choć nie będzie to łatwe zadanie dla osoby nie mającej doświadczenia w tego typu badaniach. Badania zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach. Autorka posłużyła się prostymi narzędziami statystycznymi do określenia istotności różnic pomiędzy wariantami badawczymi.

Niedociągnięcia jakie stwierdziłem w powyższym rozdziale

Na stronie 25 - jest „zawierającym ampicylinę” a na 26 stronie z „dodatkiem ampicyliny” która wersja jest prawidłowa?

Bardzo często podczas różnych analiz Doktorantka używa sformułowania „przez noc” str. 26, 29, 36, 38 – jest to mało precyzyjne, zwłaszcza że noc w naszej szerokości geograficznej może trwać od 8 do 16 godzin w zależności od pory roku,

Podobnie sformułowanie „w temperaturze pokojowej” str. 27, 29, 30, 38 jest mało precyzyjne i temperatura powinna być wyrażona w °C.

Na stronie 36 - Doktorantka podaje producenta przeciwciał „Thermo Scientific” a na stronie następnego producentem tych przeciwciał jest „Thermo Fisher Scientific”

Na stronie 40 - dowiaduje się, że do badań „wykorzystano pięciodniowe larwy” – na ten temat nie ma informacji w podrozdziale 3.1.1. Materiał badawczy – *D. rerio*. Tam jest informacja, że do badań wykorzystano zarodki w 24, 48, 72, 96 oraz 120 godzinie po zapłodnieniu, a to nie to samo.

Wnikliwa analiza tego rozdziału wykazała również wiele braków dotyczących opisu postępowania z podanymi szokowi cieplnemu zarodkom *D. rerio* oraz osobnikom dorosłym.

W podrozdziale - 3.1.3 Indukcja stresu termicznego na str. 24 napisane jest że „dorosłych osobników *D. rerio* nie poddawano opisanemu procesowi” to w jaki sposób uzyskano poniższy wynik znajdujący się na stronie 56 w podrozdziale 4.4 Lokalizacja Hspb8 w mięśniach *D. rerio* w warunkach optymalnych oraz po szoku cieplnym - uzyskano poniższe wyniki „wyniki analiz immunohistochemicznych wykazały obecność białka Hspb8 w mięśniach szkieletowych zarodków oraz dorosłych osobników *D. rerio*” oraz „Hspb8 charakteryzuje się regularnym wzorem rozmieszczenia w sarkomerach włókien mięśniowych. Wykazano kolokalizację Hspb8 z α -aktyniną (marker linii Z) w zarodkach 2 dpf w warunkach fizjologicznych (kontrolnych) oraz po szoku cieplnym (Ryc. 19, 20)”.

Rozdział „**Wyniki**” napisany jest bardzo jasno i czytelnie. Wyniki każdego eksperymentu prowadzą do wyjaśnienia danego problemu badawczego. Na pozytywną opinię zasługuje opis tylko najważniejszych i istotnych wyników badań, bez zbędnych opisów wyników nie mających większego znaczenia. Wyniki rozprawy mogą stanowić doskonały materiał do kontynuacji dalszych badań mających na celu zrozumienie molekularnych podstaw chorób powodowanych mutacjami w genie *hspb8*. Nie mam do tego rozdziału większych zastrzeżeń. Prosiłbym jedynie o odniesienie się do poniższych uwag i udzielenie odpowiedzi na zadane pytania.

Rycina 6 przedstawia zarodki danio będące w 24hpf, to dlaczego tak znacznie różnią się wielkością? Brakuje skali.

Rycina 7 - nieczytelny opis na skali.

W podrozdziale 4.3.2 Analiza Western blot Hspb8 w rozwoju - na stronie 54 możemy przeczytać „największy poziom dimerów Hspb8 obserwowany był po trzech godzinach od zakończenia szoku cieplnego (HS+2h), co sugerować może wzrost aktywności czaperonowej białka Hspb8 po zadziałaniu szoku cieplnego. W piątej godzinie po zadziałaniu szoku cieplnego (HS+4h) poziom dimerów spada – prosiłbym o wyjaśnienie skąd takie wnioski, skoro w materiałach i metodyce nie ma wzmianki o pobieraniu prób do analiz od 3 do 5 godzin po zastosowaniu szoku cieplnego.

Rozdział „**Dyskusja**” jest bardzo merytoryczny. Doktorantka dokonała dogłębnej analizy wyników badań właściwie je interpretując. Swoje wyniki odniosła do nielicznych dostępnych danych literaturowych. W dyskusji doktorantka dowiodła, że wyniki jej rozprawy stanowią bardzo dobry materiał wyjściowy do kolejnych badań związanych z mutacjami w genie *hspb8*.

Rozdział „**Podsumowanie wyników i wnioski końcowe**” jasno przedstawia najważniejsze osiągnięcia rozprawy.

Na końcu pracy oprócz streszczenia w języku polskim i angielskim znajduje się obszerny rozdział „**Bibliografia**”. Znajduje się tam spis 91 pozycji literaturowych, głównie anglojęzycznej,

z których treści doktorantka korzystała podczas przygotowywania wspomnianej rozprawy doktorskiej.

Dokładna analiza opracowania wykazała kilka drobnych nieścisłości. Dotyczy to zwłaszcza „Bibliografii”, w której spis piśmiennictwa jest niejednorodny. Po dokładnym przeanalizowaniu spisu literatury dostrzegłem kilka brakujących prac, które były cytowane w rozprawie doktorskiej, a mianowicie:

Arndt i wsp., 2010 - str 13

Kimmel i wsp., 1995 – str. 22;

Sun i wsp., 2010; - str. 67

Westerfield, 2000 - str 22

Błędnie podano rok wydania:

Na stronie 68 jest Wright i wsp. 1987 a powinno być Wright i wsp. 1989,

Brak cytowań poniższych pozycji literatury w tekście rozprawy

Augustyn, R. C. (2004). α -crystallin: A review of its structure and function. *Clinical and Experimental Optometry*, 87(6), 356–366.

Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. In *Experimental Eye Research*. 76(2), 145–153.

Petko, L., Lindquist, S. (1986). Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell*, 45(6), 885–894.

Van Montfort, R., Slingsby, C., Vierling, E. (2001). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Advances in Protein Chemistry*, 59, 105–156.

Pozycja 70 znajduje się w nieodpowiednim miejscu w alfabetycznym spisie literatury

70. Peter, E., Candido, M. (2002). The Small Heat Shock Proteins of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Structure, Regulation and Biology. In: Arrigo, AP., Müller, W.E.G. (eds) *Small Stress Proteins*. Progress in Molecular and Subcellular Biology, vol 28. Springer, Berlin, Heidelberg.

3. Wniosek końcowy

Autorka rozprawy, Pani mgr Ewelina Posyniak, podjęła się pracy nad bardzo ciekawym oraz istotnym z punktu widzenia genetyki problemem. Wymienione przeze mnie powyżej niedociągnięcia i błędy edytorskie są stosunkowo łatwe do usunięcia, niekiedy wręcz „kosmetyczne”. Nie wpływają one na moją pozytywną opinię o osiągnięciu Doktorantki i jakości jej rozprawy doktorskiej. Mam nadzieję, że Doktorantka podczas publicznej obrony ustosunkuje się do nich i rozwieje wszystkie wątpliwości.

Atutem rozprawy są bardzo skomplikowane i długotrwałe badania laboratoryjne. Doktorantka perfekcyjnie zaplanowała wszystkie analizy, przeprowadzając je w sposób bardzo rzetelny. Co najważniejsze, doktorantka bardzo dobrze zinterpretowała wyniki swoich badań i wykreowała wnioski dające możliwość realizacji dalszych prac. Biorąc pod uwagę całokształt

rozprawy mogę stwierdzić, że kandydatka na doktora, niewątpliwie potrafi prowadzić eksperymenty naukowe, jest w stanie zorganizować badania laboratoryjne, opracować materiał badawczy, opracować wyniki i odnieść je do stosownej literatury oraz przedstawić w formie publikacji.

Oceniana rozprawa doktorska rozwiązuje oryginalny problem badawczy. Znacznie poszerza dotychczasową wiedzę o lokalizacji i funkcjach małego białka szoku cieplnego Hspb8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*.

Konkludując stwierdzam z pełnym przekonaniem, że rozprawa doktorska pani mgr Ewelina Posyniak, zatytułowana „Lokalizacja i funkcje małego białka szoku cieplnego HSPB8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*” spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r., w związku z tym przedkładam Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 23 października 2024 roku.

