

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Posyniak pt.: „Lokalizacja i funkcje małego białka szoku cieplnego HSPB8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*”
wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Małgorzaty Daczewskiej**

Białka szoku cieplnego (HSP) należą do białek opiekuńczych, których ekspresja wzrasta pod wpływem różnych czynników stresowych. Zainteresowanie tymi białkami wzrasta z uwagi na ich udowodnioną rolę w patogenezie ważnych chorób neurodegeneracyjnych, w tym chorób układu mięśniowo-nerwowego. Ich sekwencja aminokwasowa jest silnie konserwatywna. W mojej opinii tematyka pracy ocenianej rozprawy doktorskiej dotycząca poznania pełnego profilu ekspresji genu *hspb8* oraz funkcji tego białka w mięśniach na modelu *Danio rerio* bardzo dobrze wpisuje się w nurt tych nowoczesnych badań. Dodatkowo aspekt możliwości praktycznego wykorzystania wyników badań w lepszym poznaniu i ewentualnym leczeniu chorób spowodowanych mutacjami w genie *hspb8* podnosi znaczenie i ważność badań prowadzonych przez Zespół Pani Profesor Daczewskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera 85 stron, w tym 24 ryciny. Rozprawa doktorska mgr Eweliny Posyniak ma układ właściwy pracom naukowym i zawiera rozdziały takie jak: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie z wnioskami, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię.

Tytuł „Lokalizacja i funkcje małego białka szoku cieplnego HSPB8 w mięśniach szkieletowych *Danio rerio*”, w mojej opinii, nieprecyzyjnie określa cele i zadania badawcze poruszone w rozprawie doktorskiej. Trzecim celem, postawionym przez Autorkę było „zlokalizowanie Hspb8 w wybranych organach dorosłego *D. rerio*”. Następnie w *MM* poznajemy te wybrane narządy i tkanki: mózg, serce, wątrobę, nerki oraz tkankę mięśniową.

Pracę doktorską rozpoczyna *Wstęp*, składający się z dwóch rozdziałów, z pięcioma podrozdziałami, w którym Autorka krótko ale komunikatywnie charakteryzuje małe białka szoku cieplnego, ze szczególnym uwzględnieniem białka Hspb8, związanego z patogenezą wielu chorób neurodegeneracyjnych. I właśnie to białko mgr Ewelina Posyniak wybrała do swoich badań. Natomiast modelem do badań została ryba danio pręgowane *Danio rerio*, jeden

z najważniejszych w ostatnich latach modeli chorób człowieka. Ze względu na prosty i dość tani sposób prowadzenia hodowli, łatwe rozmnożenie w warunkach kontrolnych, niezwykle krótki cykl życiowy jak na zwierzę kręgowie i wiele innych cech, czynią danio przegowane doskonałym modelem do badań. Powyższe powody udowadniają, w mojej ocenie, że zarówno problem jak i model badawczy zostały wybrane prawidłowo. *Wstęp* napisany jest w sposób jasny, zrozumiałym i zwięzłym językiem. Doktorantka udowadnia, że jest merytorycznie przygotowana do przeprowadzenia doświadczenia badawczego i interpretacji wyników.

Cele pracy obejmowały zlokalizowanie transkryptu *hspb8* oraz analizę poziomu ekspresji genu *hspb8* w rozwoju zarodkowym *D. rerio*, zlokalizowanie białka Hspb8 w tkance mięśniowej szkieletowej w rozwoju zarodkowym oraz w wybranych narządach dorosłych ryb a także zbadanie interakcji pomiędzy Hspb8 a potencjalnymi partnerami białkowymi. Cele przedstawione zostały przez Doktorantkę w sposób klarowny i udowadniają, że ich realizacja istotnie poszerza dotychczasową Jej wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego. Brakuje mi jednak w rozprawie doktorskiej mgr Eweliny Posyniak hipotez badawczych, które zdecydowanie ułatwiają interpretację wyników i sformułowanie wniosków.

Rozdział *Materiały i metody* Autorka rozpoczęła od scharakteryzowania danio przegowanego jako modelu badawczego, w tym jego sposób pozyskania, warunków hodowli, sposób przeprowadzenia tarła oraz indukcji szoku termicznego. Ta ostatnia czynność była podstawą uzyskania zarodków i larw do dalszych badań dotyczących lokalizacji i funkcji małego białka szoku cieplnego. Niestety opisana została bardzo krótko i, w mojej opinii, nieprecyzyjnie. Po pierwsze, Autorka nie powołała się na literaturę, w której zastosowano już tę metodę, nie opisała też sposobu opracowania tej metody. Dlaczego szok termiczny trwał jedną godzinę, nie dłużej i nie krócej? Dlaczego wybrano temperaturę 37°C? Dlaczego zarodki lub larwy pobierano do badań po jednej godzinie od przeniesienia do temperatury fizjologicznej dla tego gatunku czyli około 28°C? I tu zaczyna się kolejny problem bo właściwie nie wiem ile czasu (godzin) upływało od przeniesienia zarodków lub larw „ze świeżego roztworu o temperaturze 28,5°C” do dalszych procedur. W *MM* podano, że jedna godzina (strona 24) ale już w *Wynikach* dwie godziny, np. w opisie Ryciny 8 (HS + 2h, „zebranie materiału po dwóch godzinach”), Ryciny 9, 10 i 11. Natomiast w opisie wyników dotyczących analizy Western blot (rozdział 4.3.2) Autorka napisała, że „...po trzech godzinach od zakończenia szoku cieplnego (HS+2)” – dodatkowo nie rozumiem dlaczego jest HS+2 a nie HS+3; w kolejnym zdaniu na tej samej stronie maszynopisu, czyli 54 Autorka napisała, że „W piątej godzinie po zadziałaniu szoku cieplnego (HS+4)...”. Podobnie jest w opisach innych Rycin zawartych w *Wynikach*.

Niejednolity, nieprecyzyjny, czasami mylący sposób opisu, inny w *Materialach i metodach*, a następnie inny w *Wynikach* nie pozwala na rzetelną analizę uzyskanych rezultatów, utrudnia czytelnikowi podążanie za przedstawionymi przez Autorkę wynikami. Bardzo proszę Panią mgr Ewelinę Posyniak o skrupulatne i dokładne wyjaśnienia dotyczące sposobu przeprowadzenia doświadczenia, które było podstawą do uzyskania materiału do badań.

W dalszej części *Materialów i Metod* Doktorantka zwięźle ale z uwzględnieniem wszystkich szczegółów pozwalających na powtórzenie przeprowadzonych zadań badawczych opisała zastosowane metody molekularne. W celu zlokalizowania transkryptu i poziomu ekspresji genu *hspb8* oraz zlokalizowania białka Hspb8 w mięśniach u zarodków i osobników dorosłych *D. rerio* Autorka zastosowała nowoczesne metody biologii molekularnej (hybrydyzacja in situ, izolacja RNA, reakcja PCR, RT-qPCR, Western blot, analiza immunohistochemiczna). Natomiast do zbadania interakcji pomiędzy białkiem Hspb8 a potencjalnymi partnerami białkowymi zastosowała test koimmunoprecypitacji wraz z analizą LC/MS. W tym miejscu należy podkreślić, że warsztat metodyczny Doktorantki jest rozbudowany.

Uzyskane przez mgr Ewelinę Posyniak *Wyniki* zostały wnikliwie udokumentowane i zaprezentowane na 19 stronach maszynopisu i na 19 rycinach. Jednak pojawiły się pewne niedociągnięcia i nieścisłości, o których wyjaśnienie proszę Doktorantkę podczas publicznej obrony. W całej pracy Autorka zamiennie stosuje pojęcia: zarodek i larwa co powoduje w wielu miejscach dezinformację i nie pozwala precyzyjnie poznać opisaną metodę czy wyniki. Według mnie łatwiejsze w opisie i zrozumieniu tekstu byłoby stosowanie pojęcia zarodek od momentu zapłodnienia do momentu wyklucia, następnie pojęcie larwa lub (tak jest w niektórych publikacjach) stosowanie tylko pojęcia zarodek. Do piątego dnia po zapłodnieniu kiedy larwa, mimo swobodnego poruszania się po wykluciu, nie pobiera jeszcze pokarmu tylko odżywia się żółtkiem nazywana jest nadal zarodkiem. Natomiast stosowanie tych dwóch pojęć zamiennie, bez wyjaśnienia, komplikuje zrozumienie tekstu. Następnie Autorka w opisie ryciny 24, do stadiów rozwojowych *D. rerio* zastosowała następujące terminy: „stadium kuli” i „stadium tarczy”. Bardzo proszę o ich wyjaśnienie – jakiego etapu rozwoju dotyczą? Proszę podać poprawne terminy stosowane w polskojęzycznych opracowaniach, ponieważ według mnie są to pojęcia bezpośrednio przetłumaczone z języka angielskiego. Niestety w kolejnych opisach rycin pojawiły się inne nieścisłości. Na rycinie 3 (zarodek *Danio rerio*, 48hpf) oznaczeniem SC zaznaczono rdzeń kręgowy, na rycinie 6 (zarodek *Danio rerio*, 24hpf) oznaczeniem NC oznaczono strunę grzbietową (to oznaczenie nie budzi moich wątpliwości) ale na kolejnej rycinie 7 (zarodek *Danio rerio*, 48hpf) oznaczeniem SC oznaczono też strunę grzbietową.

Natomiast na rycinach 19 i 20 w opisie zarodka w wieku 48 hpf Autorka użyła określenia cewka nerwowa – czy według Autorki rdzeń kręgowy i cewka nerwowa to synonimy? Na rycinach 6 i 7 brakuje podania skali. Poza tym na Rycinie 7 pod każdym zarodkiem jest narysowana długa kreska - co ona oznacza? W rozdziale 4.2 *Wyników*, dotyczącym poziomu ekspresji genów *hspb8* oraz *bag3* i *hsp70* w opisie wielokrotnie używano nie do końca precyzyjnego opisu, cytując: „powoduje wyraźny wzrost ekspresji *hspb8*...”, „wyraźnie podwyższony”, „na każdym badanym etapie powoduje [...] wyraźny wzrost ekspresji”, „poziom transkryptu [...] obniżony w próbach 1-2”. Proszę o wyjaśnienie czy określenia te dotyczyły różnic istotnych statystycznie? Jeśli tak, to dlaczego nie zaznaczono ich na rycinach 9 i 10?

W podrozdziale 4.2.3 *Wyników* Autorka opisała poziom ekspresji genów *hspb8* oraz *bag3* w wybranych tkankach i narządach *D. rerio* i wyniki ekspresji *hspb8* odniosła do trzech genów referencyjnych. Analiza ta wykazała różny poziom ekspresji tego genu w różnych tkankach i narządach; proszę Autorkę o próbę wyjaśnienia tego zjawiska.

Dyskusja, obejmująca zaledwie ponad 7 stron tekstu, poprowadzona jest w sposób bardzo klarowny; napisana jest prostym, zrozumiałym językiem dlatego czyta się ją z zainteresowaniem. Pani mgr Ewelina Posyniak wykazała się znajomością specjalistycznej literatury jak i umiejętnością krytycznej oceny uzyskanych wyników na tle dostępnego piśmiennictwa. Autorka analizuje otrzymane wyniki dotyczące poziomu ekspresji genu *hspb8* w zarodkach *D. rerio* w różnym wieku (np. 24, 48 hpf itd.), natomiast nie odnosi do konkretnych etapów rozwoju zarodkowego (np. etapy bruzdkowania, wczesna i późna blastula, gastrula itd.). Myślę, że uzupełnienie tych informacji w dyskusji a może i w wynikach wzbogaciłoby interpretację uzyskanych danych. Następnie Doktorantka dyskutuje wyniki dotyczące lokalizacji białka Hspb8 w mięśniach szkieletowych i wybranych narządach *D. rerio* oraz interakcji tego białka z innymi, wybranymi białkami. Tę część Dyskusji uważam za najbardziej wartościową i ciekawą. Autorka dowodzi, że wzajemne oddziaływanie pomiędzy badanymi białkami, które tworzą kompleks (Bag3-Hspb8-Hsp70) zaangażowany w proces autofagii i tworzenie tzw. granulek stresu uczestniczy najprawdopodobniej w regulacji ilości agregatów białkowych tworzących się podczas chorób neurodegeneracyjnych ssaków.

Uzyskane przez mgr Ewelinę Posyniak wyniki badań przedyskutowane z danymi dostępnymi w pracach innych autorów pozwoliły na sformułowanie siedmiu podsumowań i sześciu wniosków. W tym miejscu muszę (z radością) pochwalić Doktorantkę za wyraźne odróżnienie podsumowań i wniosków co nie zdarza się zbyt często i nie jest łatwe. Sformułowanie ważnych dla nauki wniosków wymaga znajomości tematu, dystansu do interpretacji uzyskanych rezultatów i dojrzałości naukowej, której nie zabrakło mgr Ewelinie

Posyniak. Uważam, że sformułowane wnioski są ważnymi osiągnięciami Doktorantki, stanowiącymi Jej oryginalny wkład w wiedzę biologiczną na temat lokalizacji i funkcji małego białka szoku cieplnego HSPB8 w zarodkach i wybranych narządach i tkankach *D. rerio*.

W pracy wykorzystano 92 pozycje specjalistycznego piśmiennictwa, w zdecydowanej większości anglojęzycznego, aktualnego, zacytowanego i umiejętnie wykorzystanego.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć Doktorantki można zaliczyć:

- wykazanie, że szok termiczny powoduje wzrost ekspresji genu *hspb8* w trakcie rozwoju zarodkowego *D. rerio*,
- określenie lokalizacji transkryptu mRNA w zarodkach i larwach *D. rerio*,
- wykazanie, że białko Hspb8 jest niezbędne do utrzymania homeostazy białek zlokalizowanych w różnych narządach,
- udowodnienie, że formą aktywną biologicznie białka Hspb8 są dimery,
- wykazanie, że białko Hspb8 pełni funkcję w procesie tworzenia kompleksu indukującego autofagię oraz w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania neuronów.

Sądzę, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają duży potencjał praktyczny w diagnostyce i terapii chorób neurodegeneracyjnych człowieka.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej jestem przekonana, że Pani mgr Ewelina Posyniak jest naukowcem zdolnym do planowania i prowadzenia badań, a także prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników. Posiada wiedzę i umiejętności niezbędne do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Chciałabym podkreślić, że wskazane w recenzji uwagi mogą być przydatne przy przygotowywaniu kolejnych prac do druku i nie mają wpływu na wysoką merytoryczną wartość ocenianej pracy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku. Na tej podstawie składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Eweliny Posyniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dorota Juchnowska