

Clermont - Ferrand 2021-10-21

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Lewickiej

pt. Lokalizacji i funkcji fosforylasy glikogenu w miogenezie Drosophila melanogaster i Danio rerio.”

Na przestrzeni ostatnich dekad obserwuje się gwałtowny wzrost badań przeprowadzonych na gatunkach zwierząt modelowych w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Pani mgr Anna Lewicka podjęła się zbadania “Lokalizacji i funkcji fosforylasy glikogenu w miogenezie *Drosophila melanogaster* i *Danio rerio*”. Praca zrealizowana w Zakładzie Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem specjalistek w tej dziedzinie, prof. dr hab. Małgorzaty Daczewskiej i dr Marty Migockiej-Patrzałek.

Wstęp rozprawy doktorskiej został przygotowany przez Autorkę wyczerpująco i interesująco. Rozdział ten, ściśle związany z tematem i celem pracy Doktorantka opracowała bazując na doniesieniach z najnowszej literatury światowej. Treści części teoretycznej rozprawy doktorskiej są wyważone tematycznie i stopniowo wprowadzają czytelnika do zagadnień podejmowanych w części eksperymentalnej dysertacji. Doktorantka opisuje szczegółowo typy włókien mięśniowych u kręgowców. Zwraca także szczególną uwagę na proces rozwoju, wzrostu i regeneracji mięśni. Bardzo wnikliwie jest też opisany proces somitogenezy kręgowców, w szczególności danio pręgowanego, w zarodkach kurzych i człowieka -

Pani mgr wykazała się również głęboką wiedzą dotyczącą rozwoju mięśni u drugiego gatunku modelowego *Drosophila melanogaster*. Bardzo dokładnie jest również opisana organizacja i funkcjonowanie aparatu kurczliwego mięśni. Brakuje mi jedynie informacji o genach i

mechanizmie, który reguluje przepływ jonów Ca^{+2} z reticulum endoplazmatycznego do cytoplazmy komórki mięśniowej, jak również jakie są konsekwencje zaburzenia równowagi tego procesu, szczególnie że Autorka cytuje prace Jocelyn Laporte. Proszę o krótki komentarz.

Bardzo dokładnie została również opisana przez Autorkę rola glikogenu w organizmie człowieka, jak również w organizmach modelowych. Jak wiadomo cukier ten stanowi źródło dodatkowej energii. Rola jego zależna jest od jego lokalizacji komórkowej. Autorka zwraca szczególną uwagę na jego rolę w mięśniach, gdyż tam jest użyty jako bezpośrednie źródło energii do pracy mięśni. Anomalie, które są związane z dysfunkcją glikogenu prowadzą do wielu chorób metabolicznych. Z tego też powodu cel pracy postawiony przez Doktorantkę jest bardzo klarowny. Mimo dużej wiedzy na temat glikogenazy V, rola tego enzymu w procesie różnicowania mięśni szkieletowych jest bardzo słabo poznana.

Zadania wytyczone przez Doktorantkę prawidłowo i jasno wytyczają główny cel rozprawy doktorskiej, którym jest zbadanie lokalizacji oraz funkcji fosforylasy glikogenowej w procesie miogenezy u wybranych gatunków modelowych.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka precyzyjnie opisała szereg procedur wykonanych podczas realizacji projektu. Ta część rozprawy napisana jest bardzo dokładnie z dużą starannością i precyzją.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę prowadzone były w oparciu o najnowsze techniki stosowane w biologii molekularnej i biologii rozwoju. Analizę wyników rozpoczęła Autorka od bardzo precyzyjnego opisu wzoru ekspresji genu pygma w różnych stadiach rozwojowych *D. rerio* za pomocą techniki ISH. Został również bardzo dokładnie opisany poziom białek Pygm. Badania prowadzone przez Autorkę po raz pierwszy pokazały że miofosforylaza glikogenowa jest zróżnicowana eksprymowana, w zależności od typu włókien mięśniowych szybkich i wolnych.

W dalszej części swojej dysertacji Autorka opisuje zmiany stężenia poziomu glikogenu w zarodku *D. rerio*, brakuje mi jednak podobnej analizy w rozwoju *Drosophila melanogaster*. Czy mogłaby się Pani ustosunkować do tego komentarza?

Analiza funkcjonalna jest również przeprowadzona bardzo szczegółowo u dwóch gatunków badawczych. Przeprowadzone są bardzo dokładne pomiary morfologiczne jak i dokładna analiza tkanki mięśniowej.

Na larwach *D. melanogaster* w trzecim stadium rozwojowym przeprowadzono testy behawioralne. Wszystkie wyniki są potwierdzone analizą statystyczną.

Doktorantka szczegółowo opisuje uzyskane przez siebie wyniki, bogato ilustrując je rycinami. Ponadto, czytelnikowi krok po kroku wyjaśnia celowość przeprowadzanych doświadczeń, każde z nich podsumowując krótkim komentarzem. Wszystko to powoduje, że tekst czyta się zrozumiale. Na uwagę zasługuje wysoka jakość rycin przedstawiających obrazy uzyskane w mikroskopie konfokalnym i elektronowym oraz ich klarowny opis. Mam pytanie dotyczące struktury mięśni obserwowanej w przypadku obniżenia ekspresji *GlyP* specyficznie w mięśniach u *Drosophila*. Czy są obserwowane również zmiany kształtu mitochondriów w warstwie pod sarkolemmalnej i wokół jąder? Moje pytanie dotyczy również, ilu linii RNAi użyła Pani w pracy? Szkoda jedynie że nie wykonała Pani doświadczenia „Rescue” żeby pokazać, że zaobserwowane zmiany są specyficzne oraz, że nie ma tzw. efektów „off targets”.

W perspektywach proponuje Autorka użycie *Drosophila* do wygenerowania modelu choroby McArdle’a.

Mogłaby Pani powiedzieć w jaki sposób zaplanowałaby Pani model tej choroby u *Drosophila*? Chodzi mi głównie o modelizację Argininy R 50 do Glicyny, która prowadzi do choroby McArdle’a.

Na uwagę zasługują również bardzo ciekawe wyniki otrzymane przez Autorkę przy badaniu obniżenia poszczególnych izoform fosforylaz glikogenowych za pomocą mikroiniekcji specyficznymi oligomerami morfolino. Autorka wyraźnie pokazuje, że dochodzi do zmian morfologii tkanki mięśniowej szkieletowej, zmniejszenia średnicy włókien mięśniowych oraz zmiany w ultrastrukturze mięśni. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę świadczą o bardzo ważnej roli miofosforylaz glikogenowych w utrzymaniu prawidłowej struktury i prawidłowego

funkcjonowania mięśni. Bardzo dogłębnie jest również przeprowadzona analiza filogenetyczna wybranych gatunków zwierząt, która prowadzi do wniosku, że oba geny mają wspólnego przodka i powstały w wyniku duplikacji. W przypadku *D. melanogaster*, do tej pory został opisany tylko jeden gen (GlyP). Wykazano, że gen ten u *Drosophila* posiada dwa transkrypty. Czy mogłaby Pani wyjaśnić różnice między tymi transkryptami i podać hipotezę ich regulacji? Wiadomo również, że transkrypt *GlyP* pojawia się u zarodków *Drosophila* w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych. Jaka może być rola tego enzymu w tym okresie rozwojowym?

W dyskusji Autorka bardzo starannie podsumowuje wszystkie wyniki uzyskane podczas realizacji projektu doktorskiego, które stara się wyjaśnić w oparciu o najnowsze doniesienia z literatury. Na uwagę zasługuje również bardzo ciekawy i dojrzały sposób w jaki Autorka prowadzi dyskusję, proponując jednocześnie dodatkowe doświadczenia, które dodałyby następną "cegiełkę" w tym skomplikowanym procesie.

Chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska Pani Anny Lewickiej została przygotowana bardzo starannie. Podsumowując, uzyskane przez Doktorantkę wyniki są bardzo ciekawe i wartościowe o dużych walorach poznawczych. Jednak dziwi mnie fakt, że nie wspomina Pani o wynikach i wnioskach, jakie Pani wyciągnęła z modelu *D. melanogaster* w rozdziale Podsumowanie i Wnioski.

Pani magister jest współautorką w 6 oryginalnych publikacjach naukowych wydanych w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Wyniki swoich badań Autorka przedstawiała na licznych konferencjach.

Rozprawa doktorska mgr Anny Lewickiej pt. "Lokalizacja i funkcja fosforylasy glikogenu w miogenezie *Drosophila melanogaster* i *Danio rerio*" spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Doktorantka doskonale poradziła sobie z rozwiązaniem postawionych przed nią problemów badawczych. Wykazała się inicjatywą w planowaniu i doborze wykonanych doświadczeniach. Wykonując swoje prace doświadczała się na najnowszych publikacjach z interesującej ją dziedziny, a wnioski wyciągnięte z doświadczeń są prawidłowe i przyczyniają się do głębszego poznania problemu.

Uważam rozprawę doktorską Pani mgr za wartościową. Oceniam ją bardzo wysoko i wnioskuję o jej wyróżnienie. 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. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

.

Z poważaniem
dr hab. Teresa Jagla

