

Warszawa, 12.10.2021

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Lucyny Walkowicz
pt. „Rola czynnika neurotroficznego MANF w mózgu *Drosophila melanogaster*”**

Rozprawa doktorska mgr Lucyny Walkowicz pod tytułem „Rola czynnika neurotroficznego MANF w mózgu *Drosophila melanogaster*” wykonana została w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod promotorską opieką prof. Elżbiety Pyzy. Wyniki badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w publikacji Walkowicz i wsp., (2017) pt. „Downregulation of DmMANF in glia cells results in neurodegeneration and affects sleep and lifespan in *Drosophila melanogaster*” Front. Neurosci. 11, 610, oraz w publikacji Walkowicz i wsp., “Glia expression of DmMANF is required for the regulation of activity, sleep and circadian rhythms in the visual system of *Drosophila melanogaster*” Eur. J. Neurosci., 54, 5785-5797.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania nawiązują do bardzo ważnego tematu współczesnej neurobiologii, dotyczą bowiem roli czynników neurotroficznych w układzie nerwowym. Białka należące do tej klasy protein odgrywają kluczową rolę w tworzeniu sieci neuronalnej, regulując m.in. mechanizmy tworzenia synaps, wzrostu aksonów czy plastyczności neuronalnej. Natomiast zaburzony poziom czynników wzrostu prowadzi do chorób neurodegeneracyjnych. Mimo że pierwszą neurotrofinę (czynnik wzrostu nerwów - NGF) odkryto w latach 50. XX wieku i od tego czasu ta grupa białek jest intensywnie badana, to wciąż mechanizm i efekty działania neurotrofin w ośrodkowym układzie nerwowym nie zostały dokładnie poznane.

Przedmiotem recenzowanej rozprawy jest czynnik neurotroficzny DmMANF (z ang. *Drosophila melanogaster* Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor). Białko to jest niezbędne w trakcie rozwoju układu nerwowego, ale także wpływa na prawidłowe funkcjonowanie mózgu dorosłych osobników. Podstawową funkcją tego białka jest regulacja poziomu dopaminy. Co ciekawe, w mózgu dorosłych osobników białko to występuje zarówno w komórkach glejowych, jak i w neuronach. Ponieważ ekspresja *DmMANF* jest tak powszechna, celem prezentowanej tu rozprawy doktorskiej było określenie



roli, jaką DmMANF pełni w układzie nerwowym *Drosophila melanogaster*. Założeniem pracy było poznanie funkcji DmMANF w neuronach oraz specyficznie w neuronach zegara biologicznego oraz gleju, z uwzględnieniem gleju astrocytarnego i okrywającego. W badaniach użyto szerokiego wachlarza metod behawioralnych, metod biochemicznych i biologii molekularnej oraz obrazowania mikroskopowego.

Pani mgr Lucyna Walkowicz zbadała lokalizację i poziom białka DmMANF w układzie wzrokowym *Drosophila melanogaster* oraz wykazała jego zależność od płci i wieku owadów. Wykazała, że białko DmMANF w neuronach i komórkach glejowych determinuje zachowanie owadów. W eksperymentach z wyciszeniem ekspresji *DmMANF* w gleju pokazała, że białko to reguluje rytm okołodobowy zmian poziomu podjednostki α pompy sodowo-potasowej. Co więcej, samo wyciszenie *DmMANF* wpływa na ekspresję genów i indukuje degenerację komórek glejowych w lamina, wpływa na prawdopodobieństwo przeżycia, kondycję oraz długość snu owadów. Doktorantka pokazała, że poziom białka (zarówno wyciszenie ekspresji, jak i jego nadekspresja) w gleju astrocytarnym i okrywającym wpływa na aktywność całkowitą zarówno w warunkach światła ciemność, jak i w stałej ciemności. Czynniki neurotroficzne MANF w gleju astrocytarnym bierze udział w kierowaniu zakończeń aksonalnych małych neuronów brzuszno-bocznych do grzbietowej części mózgu. W neuronach zegara okołodobowego białko to reguluje aktywność okołodobową, a jego poziom wpływa na morfologię neuronów brzuszno-bocznych.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, liczy aż 201 stron, a jej układ jest typowy dla oryginalnych publikacji naukowych o charakterze doświadczalnym. Praca jest ilustrowana 40 kolorowymi rycinami, które ułatwiają zrozumienie i interpretację wyników. Na końcu umieszczona jest lista publikacji, spis rycin i tabel zamieszczonych w pracy. Rozprawa poprzedzona jest spisem publikacji z wiodącym autorstwem Doktorantki i zawierających część wyników zamieszczonych w omawianej rozprawie, streszczeniem w j. polskim i angielskim, spisem treści oraz listą skrótów.

Rozdział *Wstęp* liczy 33 strony i zawiera wszystkie ważne wiadomości potrzebne do zrozumienia rozprawy. Obejmuje on opis czynników neurotroficznych oraz charakterystykę modelu badawczego tj. *Drosophila melanogaster*. Znaczną część *Wstępu* stanowi doskonałe wyjaśnienie lokalizacji i molekularnych podstaw funkcjonowania zegara okołodobowego, a zawarte w nim treści świadczą o znajomości aktualnego piśmiennictwa. *Wstęp* jest dobrze napisany pod względem zarówno językowym, jak i merytorycznym.

Cel pracy natomiast jest niejasno sformułowany. W mojej ocenie jest to najslabsza część pracy. Brakuje jasno sformułowanej hipotezy badawczej i szczegółowych celów pracy. Cel pracy sprowadza się



do jednego zdania „Głównym celem prowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań było opisanie roli czynnika neurotroficznego DmMANF w układzie nerwowym *D. melanogaster*”. Zbyt wiele miejsca poświęcono za to na ponowne streszczenie wyników pracy oraz spekulacje na temat potencjalnych konsekwencji z nich płynących np. „badanie funkcji białka DmMANF może się przyczynić do zrozumienia mechanizmów komunikacji neuron-glej” czy „.... może mieć kluczowe znaczenie w zrozumieniu funkcjonowania całego układu nerwowego”.

Rozdział *Materiały i metody* jest obszerny (33 strony), co jest usprawiedliwione potrzebą wprowadzenia do szeregu stosowanych przez Doktorantkę metod doświadczalnych. Jestem pod wrażeniem różnorodności technik oraz szeregu linii transgenicznych zwierząt eksperymentalnych wykorzystywanych przez mgr Walkowicz.

Najważniejszym elementem rozprawy jest 74 stronicowy rozdział *Wyniki*. Składa się on z czterech części. W pierwszej Doktorantka pokazała lokalizację DmMANF w układzie nerwowym. Brakuje tu jednak wiarygodnej analizy densytometrycznej wyników uzyskanych metodą Western blot, prezentujących poziom białka DmMANF przedstawiany na rycinach 13 i 14. W mojej ocenie dwa niezależne powtórzenia eksperymentalne (N=2) nie uprawniają do tego typu analizy ilościowej, a praca nie straciłaby na jakości gdyby taka analiza w ogóle nie była prezentowana, a wnioski wyciągane były jedynie na podstawie obserwacji jakościowych, które i tak wspierają jedynie wyniki uzyskane za pomocą znakowania immunofluorescencyjnego.

W kolejnym podrozdziale poddano analizie wpływ nadekspresji i wyciszenia ekspresji *DmMANF* w gleju i neuronach m.in. na długość życia, kondycję, aktywność lokomotoryczną oraz długość snu owadów. Moją wątpliwość budzi ta ostatnia analiza. Jak Doktorantka interpretuje wartość parametru $p=0$ (prawdopodobieństwo testowe) uzyskaną w testach statystycznych (strona 109)? W rozdziale tym Doktorantka kilkakrotnie (np. str. 99, 104) tłumaczy uzyskane istotnie statystyczne wyniki będące efektem wyciszenia lub nadekspresji *DmMANF*, obecnością w genomie konstruktów genetycznych pisząc przykładowo: „Różnice te najprawdopodobniej nie były efektem samego wyciszenia, a jedynie wynikiem przeprowadzenia manipulacji genetycznych w genomie owada” (np. str. 99, 104). Chciałem zapytać czy to stwierdzenie nie może dotyczyć wszystkich wyników prezentowanych w rozprawie i dlaczego tłumaczy tylko ich część? Czy w prowadzonych przez Doktorantkę badaniach możliwe jest wykonanie eksperymentu typu „rescue” przywracającego poziom białka po wyciszeniu ekspresji *DmMANF* oraz efekty z tym związane? Dalej w tym samym rozdziale opisane zostały badania wpływu wyciszenia *DmMANF* w



komórkach glejowych na ekspresję podjednostki α pompy sodowo-potasowej oraz analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka wykazała wpływ poziomu badanego czynnika neurotroficznego w komórkach gleju astrocytarnego i okrywającego na aktywność i sen owadów oraz na rozwój neuronów brzuszno-bocznych zegara. W ostatnim podrozdziale *Wyników* mgr Walkowicz pokazała bezpośredni wpływ wyciszenia ekspresji *DmMANF* w neuronach zegara biologicznego na morfologię neuronów brzuszno-bocznych.

W rozdziale *Dyskusja* (12 stron) Doktorantka dobrze opisała i przedyskutowała otrzymane wyniki. Rozdział ten kończy się podsumowaniem, które moim zdaniem nie koresponduje z imponującym zakresem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i szerokim wachlarzem użytych technik eksperymentalnych. Dlatego chciałem poprosić Doktorantkę o podsumowanie i wskazanie w czasie prezentacji wyników rozprawy co jej zdaniem jest tym najważniejszym wynikiem pracy.

Podsumowując, pomimo wymienionych powyżej kilku szczegółowych uwag krytycznych, rozprawę doktorską Pani mgr Lucyny Walkowicz oceniam wysoko. Zawarte w pracy wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat roli czynnika DmMANF w mózgu *D. melanogaster*. 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 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Lucyny Walkowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Włodarczyk