

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

Imię i nazwisko kandydata: mgr BERNADETTA BILSKA

**Tytuł rozprawy doktorskiej: ROLA ZEGARA OKOŁODOBOWEGO W REGULACJI
WRODZONEJ ODPORNOŚCI U SSAKÓW I OWADÓW**

Promotor: prof. dr hab. ELŻBIETA PYZA

**Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): dr MILENA
DAMULEWICZ**

Recenzent: prof. dr hab. KRYSZYNA SKWARŁO-SOŃTA

1. **Wartość naukowa rozprawy**
 - a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Rozprawa dotyczy udziału molekularnego zegara biologicznego w kontroli okołodobowej zmienności procesów odporności wrodzonej u dwóch modelowych organizmów: myszy, gatunku ssaków dominującego w badaniach immunologicznych, oraz *Drosophila melanogaster* potocznie zwanego „muszką owocową”, gatunku owada chyba najbardziej popularnego w badaniach molekularnych. Ze względu na złożoność i różnorodność procesów odpornościowych doktorantka mogła przebiegać w ogromnym arsenale reakcji obronnych, z których wybrała ekspresję genów kodujących peptydy antybakteryjne. Analiza dobowej zmienności odporności antybakteryjnej skóry myszy i jej kontrola przez zegar endogeny to bardzo cenne podejście badawcze, mogące w przyszłości przyczynić się do zrozumienia, w której fazie doby uruchamiane są procesy zwalczające infekcje bakteryjne a kiedy aktywowane są reakcje ukierunkowane na regenerację i gojenie ran. Pozornie odległe tematycznie wątki w badaniu odporności *Drosophila* są w gruncie rzeczy przerzuceniem pomostu między kręgowcami i bezkręgowcami, bowiem doktorantka zidentyfikowała w materiale pochodzącym od owada peptyd, będący odpowiednikiem znanego u ssaków czynnika antybakteryjnego. To odkrycie było możliwe dzięki wykorzystaniu wielu narzędzi nowoczesnej biologii molekularnej: od wytypowania *in silico* struktury poszukiwanej cząsteczki aż po końcowe badania funkcjonalne, osadzone w kontekście rytmiki okołodobowej. Taki układ doświadczalny dysertacji decyduje o jej nowatorstwie i znacznej wartości naukowej, świadczy o bogatym warsztacie metodycznym doktorantki i stwarza możliwość pogłębionej analizy i wskazania dalszych kierunków badań.

- b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Rozprawę stanowią dwa artykuły opublikowane w recenzowanych czasopismach (Experimental Dermatology, IF 3,96 i Current Issues of Molecular Biology, IF 2,08), wysoko punktowanych także przez MEiN, uzupełnione krótkim tekstem skonstruowanym jak standardowy opis badań eksperymentalnych. Artykuły były wcześniej oceniane przez niezależnych recenzentów wydawniczych, zatem sam fakt ich opublikowania wskazuje na wysoką wartość naukową uzyskanych i opisanych wyników. W części dotyczącej antybakteryjnej odporności skórnej myszy zostało wykazane, że dobowy wzorzec aktywności lokomotorycznej gryzonia determinuje przesunięcie procesów odpornościowych w kierunku ochrony przed urazami, ale też występują tu komponenty

kontroli przez zegar endogeny. Dodatkowo wykazanie w wątrobie myszy rytmicznej ekspresji genów kodujących peptydy antybakteryjne potwierdza rolę molekularnego zegara peryferycznego w podtrzymywaniu zdolności organizmu do naprawy uszkodzeń, na jakie narażony jest organizm w wyniku zwykłej aktywności życiowej. Podobne właściwości antybakteryjne wykazuje zidentyfikowany przez doktorantkę peptyd kodowany przez geny związane z męskim układem rozrodczym *D. melanogaster*. W tym układzie doświadczalnym także stwierdzono zmienność dobową obrony przeciwbakteryjnej, wykazując ponadto jej związek zarówno z genomem owada jak i podatnością popularnych szczepów bakteryjnych na uszkodzanie ich zewnętrznej otoczki przez badany peptyd. Wielką zaletą ocenianej rozprawy jest wskazanie możliwości kontynuacji tak owocnie rozpoczętych badań i o tych potencjalnych kierunkach chciałabym porozmawiać z doktorantką podczas publicznej obrony.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Podjęta tematyka badawcza, obejmująca ocenę dobowej zmienności wybranych elementów odporności nieswoistej dwóch odległych ewolucyjnie modelowych gatunków zwierząt, wymagała dobrej znajomości ogromnego arsenału metodycznego i umiejętności finezyjnego eksperymentowania, zwłaszcza z użyciem różnych wariantów genetycznych *Drosophila* (często używanych przez zaprzyjaźnione zagraniczne ośrodki naukowe). Ważnym elementem była także dostępność znakomitego zaplecza aparaturowego i technicznego, czego najwyższym wyrazem są doświadczenia opisane w publikacji 2. Nie bez znaczenia jest również umiejętność interpretacji uzyskanych wyników, pozwalająca na wykrycie u *D. melanogaster* antybakteryjnego potencjału peptydu, będącego analogiem znanego u ssaków czynnika o porównywalnej aktywności. Te właściwości oceniane były w stosunku do trzech różnych gatunków bakterii, przy użyciu całego spektrum metod molekularnych, mikrobiologicznych a także z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Tutaj na podkreślenie zasługuje chyba także intuicja doktorantki, badającej aktywność antybakteryjną w stosunku do trzech popularnych gatunków bakterii, z których najpowszechniejszy, gronkowiec złocisty, okazał się oporny na działanie nowego peptydu. Aż strach pomyśleć, do jakich wniosków mogłoby doprowadzić przeprowadzenie tej oceny tylko z użyciem tego gatunku bakterii! Trochę żal, że tę część badań opisuje doktorantka w swoim komentarzu bardzo skrótowo i jakby bez osobistego zaangażowania, pozostawiając czytelnikowi wnikliwie studiowanie załączonej publikacji, skądinąd bogato dokumentowanej z interesująco prowadzonym wątkiem tekstowym.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Obydwie publikacje są wieloautorskie, dlatego są uzupełnione deklaracjami współautorów dotyczącymi formy i zakresu udziału w powstaniu pracy. Zwykle jest to od kilku do kilkunastu procent, często obejmujących wykonanie konkretnego działania (np. zaprojektowanie primerów, pomoc w wykonaniu doświadczeń czy udział w ostatecznej redakcji tekstu), zaś doktorantka w obu pracach jest pierwszą autorką i ocenia swój wkład na 60 i 55%. Oprócz publikacji, nazwanych tu „Załącznikami” (a także streszczenia po polsku i angielsku) dysertacja zawiera także tekst z rozbudowanym „Wprowadzeniem” i wyodrębnionym „Celem pracy”. W dalszej części znajdujemy krótkie omówienie wyników z dyskusją (zawierającą dobrą ilustrację, będącą zapewne kopią abstraktu graficznego do publikacji stanowiącej załącznik 1), „Podsumowanie”

i „Bibliografię” (cytowane są 53 pozycje piśmiennictwa, tylko częściowo powtarzające prace z Załączników). „Wprowadzenie” poświęcone jest prawie w całości prezentacji zegara molekularnego ssaków i owadów, ilustrowanej barwnymi schematami. Pewną trudność w ocenie poprawności redakcyjnej rozprawy nastęcza punkt 2 podrozdziału „Cel pracy”, wymieniający określenie dobowego wzorca ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych u *D. melanogaster*. Doktorantka podkreśla, że wyniki tych badań nie są jeszcze opublikowane, ale wyraźnie mówi o ich istnieniu w tym opracowaniu, a nawet wymienia ten fakt w podsumowaniu – jest mi trudno przyjąć takie wyjaśnienie, bowiem tych wyników po prostu nie przedstawiono.

4. Uwagi krytyczne

Ponieważ obydwie publikacje stanowiące trzon ocenianej dysertacji są wieloautorskie, a doktorantka swój wkład ocenia na nieco ponad połowę, to dobrą okazję do wykazania wiodącej roli w powstaniu całej dysertacji mogło stanowić opracowanie tekstu wprowadzającego, z której jednak doktorantka nie do końca skorzystała. O ile bowiem każda z publikacji dotyczy odrębnych zadań, analizujących odporność wrodzoną modelowego gatunku kręgowca (załącznik 1) i bezkręgowca (załącznik 2) w bardzo różnych układach doświadczanych, to zegar biologiczny stanowiący zwornik tych badań mógłby być omówiony w sposób podkreślający ważność kontroli dobowych zmian procesów odpornościowych. Szczegółowe opisywanie molekularnych podstaw funkcjonowania zegara miałyby tu znacznie mniejsze znaczenie – zwłaszcza od czasu przyznania w roku 2017 Nagrody Nobla za jego rozszyfrowanie, opisywaniem tego mechanizmu zajmują się wszyscy badacze pracujący w dziedzinie chronobiologii. Natomiast znaczenie adaptacyjne okołodobowej zmienności ochrony organizmu przez najstarsze ewolucyjnie czyli nieswoiste mechanizmy obronne ciągle jeszcze bardzo często znajduje się poza świadomością zarówno uczonych zajmujących się badaniami podstawowymi jak lekarzy, a wreszcie przeciętnych „zjadaczy chleba”. Bardzo żałuję, że doktorantka nie wykorzystała tej możliwości, bo przecież redagowanie tej części dysertacji chyba nie było ograniczone limitami objętości i mogło dostarczyć recenzentowi dobrej okazji do przekonania się, że doktorantka włożyła w jej powstanie więcej niż 55-60%. Mam więc nadzieję, że publiczna obrona będzie stanowić znakomity moment do przedstawienia poglądów doktorantki na ten temat i podjęcia dyskusji z moimi krytycznymi uwagami.

Na jednej stronie tekstu (str. 18/19) autorka wymienia 7 rodzin peptydów przeciwdrobnoustrojowych, scharakteryzowanych u badanego gatunku owadów i powiada, że sprawdzała, czy istnieją dobowe różnice w ekspresji kodujących je genów w głowach i odwłokach osobników obydwu płci. Ponieważ nie stwierdziła istnienia tych różnic, to w kilkuzdaniowej dyskusji dochodzi do wniosku, że ekspresja badanych peptydów ma charakter indukowany, więc należałoby inaczej skonstruować układ doświadczalny. Wszystko to jest jak najbardziej słuszne, ale skoro nie opisano żadnego podejścia metodycznego ani nie pokazano wyników – także tych negatywnych – to i dyskusja, nawet bardzo skrócona, wydaje się mało uprawniona. Moim zdaniem tej części po prostu nie ma i nie może podlegać ocenie a przyjęty sposób jej sygnalizowania zupełnie niepotrzebnie obniża wartość rozprawy.

Natomiast odczuwam pewną niedogodność wynikającą z braku możliwości zapoznania się z materiałami uzupełniającymi obydwu publikacji, do których dotarcie wymagałoby od recenzenta dodatkowych, i nie całkiem prostych, zabiegów. Zwłaszcza, że zapewne znacznie łatwiej mogłaby doktorantka zrobić to we własnym zakresie, np. zamieszczając ich kopie w tekście dysertacji.

