

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Małgorzaty Sekuły pt. „Morfogeneza i funkcja ciała Balbianiego w oocytach owadów o przeobrażeniu niepełnym (Hemimetabola)”

Uwagi wstępne

Pani mgr Małgorzata Sekuła przedstawiła rozprawę doktorską w dyscyplinie nauk biologicznych wykonaną na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie w Zakładzie Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców pod kierunkiem prof. dr hab. Szczepana Bilińskiego. Praca ma formę manuskryptu jednoautorskiej monografii.

Tematyka pracy koncentruje się wokół analiz mikroskopowych formowania i funkcjonowania agregatów organelli, zwanych ciałem Balbianiego, w czasie wczesnej oogenezy wybranych gatunków owadów prostoskrzydłych. Szczególny nacisk został położony na dynamikę i funkcjonowanie mitochondriów. Ciało Balbianiego (CB) już od ponad 150 przyciąga uwagę embriologów i dysponujemy już znaczną wiedzą na temat jego powstawania i roli w czasie oogenezy. O ile CB rozpoznano w wielu taksonach zwierząt to wiedza na temat jego organizacji i funkcjonowania jest często powierzchowna. Dokładniejsze badania prowadzono, jak zwykle w takich przypadkach, na gatunkach modelowych jak muszka owocowa, żaba szponiasta, danio pręgowate i mysz. Badania te ujawniły wiele funkcji tego zgrupowania organelli ale oczywiście nie wyczerpały tematyki badawczej. Wciąż istnieje potrzeba dalszych badań molekularnych na gatunkach modelowych jak i szczegółowych badań organizmów nie modelowych. W ten drugi nurt wpisuje się przedstawiona do recenzji praca. Autorka zaproponowała oryginalny cel badań, i rozwiązała postawiony problem naukowy. Jej praca wnosi nowe dane do literatury. Uważam więc,



że tematyka pracy doktorskiej p. M. Sekuła jest naukowo bardzo ciekawa, a tego typu badania są bardzo pożądane i wnoszą realny wkład w wiedzę dotyczącą oogenezy.

Chciałem tu dodać, bo nie jest to w pracy wyeksponowane, że duża część prezentowanych wyników i koncepcji ukazała się w dwóch pracach oryginalnych, w których p. M. Sekuła jest pierwszym autorem. Pierwsza praca autorstwa M. Sekuła, W. Tworzydło i S. Biliński ukazała się w *Journal of Morphology* w roku 2020 a druga w tym samym składzie autorskim w *Zoology* w roku 2022. W obu pracach pani Sekuła była autorem korespondencyjnym. Autorka pisząc więc rozprawę doktorską miała spore doświadczenie w prezentowaniu uzyskanych wyników i mogła korzystać z uwag recenzentów. Miało to zapewne spory i pozytywny wpływ zarówno na wysoką jakość prezentowanych badań jak i na bardzo dobrą formę ich przekazu.

Należy także zaznaczyć, iż praca była realizowana w ramach wsparcia finansowanego przez NCN – projekt Preludium, którego kierownikiem była Doktorantka. Doktorantka także dwukrotnie uzyskała dofinansowanie z macierzystej jednostki w ramach wsparcia działalności naukowej doktorantów. Dofinansowanie z NCN świadczy, że już na poziomie koncepcji i planów badawczych proponowane badania uzyskały wysokie noty ekspertów i recenzentów.

Merytoryczna ocena pracy

Przedstawiona rozprawa ma formę jednoautorskiej monografii naukowej o klasycznym układzie. W jej skład wchodzi: dwa streszczenia, spis treści, wykaz rysunków, tabel i wykresów, Rozdział I – Wprowadzenie, Rozdział II – Materiały i metody, Rozdział III – Wyniki, IV – Dyskusja, V- Podsumowanie i wnioski oraz, bibliografia i dokumentacja fotograficzna. Poza dokumentacją fotograficzną praca zawiera 3 schematyczne rysunki we Wprowadzeniu, 3 tabele w metodyce oraz 3 tabele i 2 wykresy w wynikach. Praca liczy 139 stron.

Cała praca jest napisana prostym i jasnym językiem. Treść pracy jest mocno skondensowana (bez bibliografii i dokumentacji fotograficznej praca liczy 59 stron tekstu), Autorka unika zbędnych powtórzeń i stara się by forma nie panowała nad treścią. To dobrze, choć są momenty, w których brakuje mi jeszcze kilku zdań komentarza czy danych literaturowych na które można sobie pozwolić tego typu opracowaniach (patrz dalej).





Rozdział I - **Wprowadzenie** (15 stron) podzielony jest na 7 sekcji i jego zadaniem jest wprowadzenie w przedmiot i przedstawienie celów badań. Rozdział ten ma formę bardzo skondensowanej pracy przeglądowej i na pewno jest wynikiem kompromisu pomiędzy chęcią Autorki by szeroko pokazać tło prezentowanych analiz - stąd krótkie opisy budowy i klasyfikacji jajników owadów, oogenezy owadów, dynamiki mitochondriów, budowy i funkcjonowania CB, a z drugiej strony chęcią by nie przeładować wprowadzenia nadmiarem danych literaturowych, które później nie są wykorzystywane w pracy. W mojej ocenie Autorka dobrze poprowadziła tę część pracy – niewiele miejsca poświęcono jajnikom i ogólnie oogenezie a więcej współczesnemu stanowi wiedzy na temat dynamiki mitochondriów i CB. Cytowana literatura jest aktualna, choć, co uznać należy za pozytyw, Autorka nie unika cytowania starszej ale wciąż wartościowej literatury. Podkreślam to bowiem wielu młodych badaczy po prostu nie zna starszej (nie z XXI wieku) literatury. Jedno ze stwierdzeń wprowadzenia, uważam za niefortunne i powielające utrwaloną, acz nieprecyzyjną wiedzę. Mianowicie, na początku sekcji I.1, opisując jajniki owadów Autorka stwierdza „W ich wnętrzu niedojrzałe komórki linii płciowej dzielą się i różnicują w dojrzałe komórki rozrodcze (komórki jajowe).” Komórki jajowe (haploidalne gamety, ootydy) nie wykształcają się w jajnikach owadów, oogeneza jest blokowana na etapie metafazy I mejozy, i do takich oocytów wnikają plemniki. Później następuje reinicjacja mejozy. Jajnik nie zawiera więc haploidalnych gamet żeńskich, ale oocyty I rzędu, bądź zapłodnione oocyty I rzędu.

Cele pracy przedstawiono w ostatniej sekcji wprowadzenia. Są to poznanie na poziomie ultrastruktury mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie i funkcjonowanie CB wybranych owadów prostoskrzydłych oraz wyjaśnienie roli CB w namnażaniu i eliminacji mitochondriów. Te dwa główne cele otoczone zostały siedmioma pytaniami badawczymi, które je uszczegółowiają i nadają im kontekst. Za szczególnie wartościowe uważam zadanie (i zweryfikowanie) tych pytań, które wychodzą poza standardowe badania mikroskopii świetlnej i elektronowej: zaliczam do nich pytania dotyczące zaangażowania białka Drp 1 w morfogenezę CB, pytania czy na terenie CB odbywa się mitofagia, czy formowanie CB jest powiązane z samoagregacją białek inherentnie nieuporządkowanych, jaka jest rola cytoszkieletu w dynamice CB?

By odpowiedzieć na tak zadane pytania Autorka wykorzystwała wiele metod badawczych. Od razu podkreślę, że szeroki wachlarz metod to wielki plus rozprawy. Wyjście poza badania czysto





morfologiczne pozwoliło na wieloaspektowe potraktowanie problemu badawczego i pozwoliło uzyskać ciekawe rezultaty, a praca wpisuje się w bardzo popularny, i dla mnie właściwy, nurt badań łączących morfologię z badaniami molekularnymi. Materiał do badań stanowiły samice pięciu gatunków owadów z rodziny Tettigoniidae (pasikonikowate) – dlaczego wybrano właśnie te owady to Autorka szczegółowo objaśnia w sekcji II.1.2. Na wszystkich pięciu gatunkach wykonano analizy podstawowe (mikroskopia świetlna i TEM), a jeden z nich, *Meconema meridionale*, posłużył do bardziej zaawansowanych badań. Uważam to za właściwą strategię badawczą, z jednej strony Autorka była w stanie zobaczyć na przykładzie kilku gatunków jak zróżnicowane może być CB a z drugiej strony mogła zająć się bardziej wyrafinowanymi metodami na jednym wybranym modelu. Te tzw. zaawansowane metody to wykonanie rekonstrukcji 3D na poziomie ultrastruktury, badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem wielu przeciwciał, detekcja agregatów białkowych, zastosowanie 1,6-hexanediolu do rozbijania kondensatów białkowych, metoda FISH, wykonanie przyżyciowych barwień przy użyciu MitoTracker Deep Red w celu detekcji potencjału błonowego mitochondriów, inkubacja z BrdU, ekstrakcja cytoplazmy i inkubacja z substancjami dezorganizującymi cytoszkielet. Chciałbym podkreślić, że wartością badań jest zaimplementowanie tych znanych przecież metod do badań nie modelowego pasikonika jakim jest *M. meridionale*, co wymagało dużych umiejętności i doświadczenia. Wykonano także analizy ilościowe. Do metodyki mam następujące pytania, uwagi i komentarze. Autorka przedstawia rekonstrukcje 3D CB oparte na 3 do max. 10 skrawkach. To być może wystarczy by stwierdzić, iż mitochondria tworzą lub nie sieci ale, za mało by takie sieci zobrazować i poznać czy to np. występuje jedna duża sieć czy kilka mniejszych. Z przedstawionej metodyki wynika że takie rekonstrukcje robione były ręcznie na podstawie krótkich serii seryjnych skrawków. By w przyszłości zobrazować trójwymiarowo CB proponuję zastosowanie metod takich jak skanowanie powierzchni boczka czy array tomography. Metody te umożliwiają uzyskanie setek obrazów seryjnych a potem ich komputerową obróbkę i pozwalają zobrazować całą ultrastrukturę danych komórek (nawet tak dużych jak oocyty) w trzech wymiarach. W przypadku znakowań przeciwciałami, autorka pisze (str. 34), że przeprowadzano kontrole negatywną. Czy przeprowadzano kontrole pozytywne? Jak oceniano specyficzność przeciwciał? W badaniach ilościowych (str. 38) liczono m. in. średnią liczbę mitochondriów znajdujących się w „bezpośrednim sąsiedztwie” nuage. Co znaczy bezpośrednie sąsiedztwo? Wyłącznie bezpośredni kontakt, czy brana była pod uwagę jakaś konkretna minimalna odległość





tych struktur? Wzięto pod uwagę 5 obrazów. Z tego samego CB? Różnych? Opis jest tu mało precyzyjny.

Najciekawszy rozdział to **Wyniki i dokumentacja**. Od razu chciałbym podkreślić

Strona | 5 doskonałą jakość dokumentacji zdjęciowej. Autorka prezentuje bardzo dobrej jakości

mikrofotografie z analiz w mikroskopie świetlnym, TEM i mikroskopie fluorescencyjnym. Bardzo ładne są także prezentowane rekonstrukcje 3D. Wyniki w sposób jasny prezentują uzyskane dane, poparte są jak wspominałem doskonałą dokumentacją. Interpretacja uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. Nowatorskie wyniki uzyskane w niniejszej pracy to między innymi:

- opis budowy, formowania i rozpadu CB u pięciu gatunków pasikonikowatych, odkrycie że CB ma różną postać morfologiczną – CB ‘kompaktowe’ i ‘rozproszone’;

- wykazanie obecności sieci mitochondrialnych, w których dochodzi do namnażania mitochondriów a mitochondria o obniżonym potencjale błonowym i/lub nieprawidłowe morfologicznie są izolowane z sieci i ulegają mitofagii;

- podobnie jak u przypadku gatunków modelowych CB pasinikowatych powstaje z udziałem białek zawierających rejony inherentnie nieuporządkowane;

- poznanie roli cytoszkieletu w postawianiu i funkcjonowaniu CB.

Do wyników i dokumentacji mam kilka szczegółowych uwag, zapytań i komentarzy. Strona 40 – jądra oocytów wczesno-prewitellogenicznych są określane jako leżące ekscentrycznie – nie widać tego na Fig. 2B. Czy to położenie ekscentryczne jest takie samo we wszystkich oocytach? Strona 41, rozmieszczenie nuage u *C. fuscus* oraz *L. albivittata* i brak korelacji z osiami oocytu. Czy zwrócono może uwagę na rozmieszczenie porów jądrowych? Czy jest korelacja między obecnością porów a obecnością materiału nuage w pobliżu osłonki jądrowej? Strona 43, liczba mitochondriów oszacowana na podstawie „wieloelementowych mikrofotografii” – nie pokazano tutaj odpowiedniej dokumentacji. Jak określano nietypowość (nie sferyczność) mitochondriów? Na podstawie obrazu o grubości jedno skrawka ultracienkiego? Strona 45 i stwierdzenie, że „że ciało Balbianiego *M. meridionale* powstaje zawsze w bezpośrednim sąsiedztwie tego fragmentu otoczki jądrowej, do którego (od strony karioplazmy) przytwierdzone są telomery chromosomów bukietowych (Ryc. 10)”. Rycina 10 bazuje na zaledwie 3 i 4 skrawkach ultracienkich i nie pokazuje całości jądra i jego



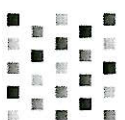


otoczenia. Czy Doktorantka dysponuje tu jakąś inną dokumentacją? Ponad to w sekcji II.5 (strona 47) wykazano, że w „okołojądrowej ooplazmie oocytów wczesno-prewitelogenicznych dochodzi do agregacji białek inherentnie nieuporządkowanych”. Białka te wydają się agregować równomiernie wokół jądra oocytu (Fig. 18A). Jak się to ma do ww. wyników?

Strona | 6

Dyskusja (18 stron) podzielona została na kilka sekcji, w których Autorka odnosi się do danych literaturowych ale także podsumowuje przedstawione analizy i np. prezentuje proponowane scenariusze pewnych procesów jak np. scenariusz transportu i lokalizacji cząsteczek Drp1 mRNA. W Dyskusji skoncentrowano się na najciekawszych dla Autorki aspektach badań, jak np. namnażanie i selektywna eliminacja mitochondriów czy formowanie CB. Dyskusja jest napisana żywo i ciekawie. Cytowana jest przeważnie aktualna literatura, choć nie brakuje odwołań do literatury trochę starszej jak w przypadku omawiania kompleksów nuage-mitochondria i wsparcia dla koncepcji z lat 80 XX w., iż nuage indukuje biogenezę mitochondriów. W rozdziale **Podsumowanie i wnioski** zebrano sześć wniosków, pięć pierwszych nie budzi moich zastrzeżeń, chciałbym jednak podyskutować o wniosku nr 6 dotyczącym ewolucyjnie pierwotnej funkcji CB. Autorka dosyć śmiało stwierdza, że taką pierwotną funkcją CB jest „namnażanie mitochondriów prawidłowych oraz eliminacja mitochondriów o obniżonym potencjale błony”. Inne funkcje CB jak np. kierunkowy transport organelli i makrocząsteczek (wykazane u gatunków modelowych) były by ewolucyjnie młodsze. Intuicyjne wydaje się, że jest to wniosek prawidłowy, ale na jakiej podstawie został wysunięty? Nie ma w pracy żadnej dyskusji na ten temat. Czy takie ogólne i ważne stwierdzenie jest uprawnione na podstawie prezentowanych badań? Rola CB w selekcji mitochondriów jest zapewne bardzo konserwatywna, ale czy pierwotna? W mojej ocenie by wysnuwać takie wnioski należało by poznać czy CB występuje i ewentualnie jak funkcjonuje u takich bazalnych zwierząt jak żebroplawy, jamochłony czy wiciowce kołnierzykowe.

Nie mam specjalnych uwag edytorskich – praca jest przygotowana bardzo starannie pod tym względem. Zdarzają się pojedyncze literówki czy inne drobne usterki – jak np. w opisie wykresu 2 na str. 45 nie mające znaczenia merytorycznego. Zaznaczyłem je na pliku PFD rozprawy, który mogę udostępnić Autorce.





Wniosek końcowy

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Strona 17 poz. 1668 z późn. zm.). Rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Sekuły prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w zakresie nauk biologicznych i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim było poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie i funkcjonowanie CB w czasie oogenezy wybranych gatunków owadów. Autorka rozprawy wykazała się także umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną prezentowanych badań wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Piotr Jurek

