



dr. hab. Joanna Szczepanowska prof. nadzw.
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, 31 stycznia 2018

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Darii Grobys

pt. „Udział kanału VDAC w patogenezie choroby Huntingtona w oparciu o badania modeli komórkowych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Kmity oraz promotora pomocniczego dr Andonisa Karachitosa z Wydziału Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Mitochondria są wielofunkcyjnymi organellami, decydującymi o życiu lub śmierci komórki. W przebiegu wielu poważnych chorób takich jak np. choroby nowotworowe, kardiomiopatie, cukrzyca oraz w szeregu chorób neurodegeneracyjnych wykazano zaburzenia funkcjonowania mitochondriów. Spośród chorób neurodegeneracyjnych, w których stwierdzono dysfunkcje mitochondriów najczęściej wymienia się chorobę Parkinsona, Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne - ALS oraz płasawicę Huntingtona. Ta ostatnia to postępująca choroba, uwarunkowana genetycznie, dziedziczna, u podłoża której leży mutacja w genie huntingtyny. Wiadomo, że zmutowana postać białka huntingtyny może oddziaływać z zewnętrzną błoną mitochondrialną i zaburzać ich funkcjonowanie. Jednym z kluczowych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej odpowiedzialnych za funkcjonowanie mitochondriów jest białko VDAC. Problematyka przedstawiona w tej rozprawie doktorskiej, czyli rola białka VDAC w patofizjologii choroby Huntingtona bardzo trafnie wpisuje się w nurt badań i znajduje głębokie uzasadnienie.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest zawarta na 155 stronach i ma w zasadzie typowy układ dla tego rodzaju opracowań. Rozpoczyna się spisem treści, streszczeniem po angielsku i polsku, wstęp liczy 40 stron. Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy znajduje się liczący 13 stron



rozdział „Materiały” i 19 stron rozdział „Metody”. Wyniki liczą 40 stron, po nich następuje 9 stronicowa dyskusja i podsumowanie obejmujące 2 strony. Rozprawa kończy się 2 stronicowym „Załącznikiem” oraz 15 stronicowym piśmiennictwem, na które składa się 285 pozycji literatury.

Ocena merytoryczna

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o dziedzinie, której poświęcona jest rozprawa, a więc znaczenia białka VDAC w funkcjonowaniu mitochondriów oraz roli białka Htt w chorobie Huntingtona. Nie mam w zasadzie uwag do tej części rozprawy, jest napisana w sposób czytelny i zrozumiały. Chciałabym jedynie zwrócić uwagę na to, że w podrozdziale 2.2.2 umieszczone są informacje na podstawie badań modelu drożdżowego bez komentarza jaki jest pośredni udział kanału VDAC w regulacji ekspresji genów u ssaków (np. rozdział 2.2.2). Brakuje mi też informacji o tym jaki jest ilościowy udział poszczególnych izoform ssaczych VDAC1/2/3 w różnych tkankach/organach (np., że najwięcej izoformy VDAC1/2 jest w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych i mózgu), a taka informacja przydatna byłaby w dyskusji wyników (np. przy ocenie ilościowej udziału izoform białka VDAC w preparatach komórek PC12).

Autorka nie ustrzegła się drobnych niefortunnych sformułowań w tej części rozprawy, których tylko przykłady pozwolę sobie przytoczyć:

1. nie powinno używać się określenia „ekspresja białka” jest „ekspresja genu białka”,
2. użyto sformułowania „10% błony komórkowej może być pokryte mitochondriami” str. 29. Właściwie powinno być napisane, że jest „zlokalizowane w pobliżu błony komórkowej”,
3. sygnały „anterograde i retrograde” nie ma takich słów w języku polskim (to są neologizmy z ang.),
4. nie używa się obecnie określenia „liczba mitochondriów”, z tego względu, że mitochondria są bardzo dynamiczną strukturą nie do policzenia, raczej używa się określenia „masa mitochondriów”
5. nie jest dla mnie zrozumiały rysunek 8, jeżeli Doktoranka chciała na tym schemacie podsumować informacje, które opisała we Wstępie, to niestety ale dla czytelnika nie jest to pomocny rysunek.



Cel pracy to według Doktorantki „sprawdzenie czy białko VDAC jest istotne dla działania Htt i/lub mHtt w komórkach, co w konsekwencji wskazywałoby na jego udział w patogenezie HD. Postanowiono także sprawdzić znaczenie obecności izoform białka VDAC dla obserwowanych efektów ekspresji Htt i mHtt.” Do realizacji tak dość szeroko postawionego celu, zostało przedstawionych sześć zadań badawczych.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych opisanych w rozdziale **material i metody**. Zawiera on spis użytych w toku badań odczynników, konstruktów/plazmidów oraz opis zastosowanych w toku pracy metod w tym: prowadzenia hodowli drożdży i komórek PC12, procedur izolacji mitochondriów itd. Opis metod jest moim zdaniem wyczerpujący i klarowny.

Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych potknięć szczególnie przy użyciu wielu potocznych i nieprecyzyjnych sformułowań np. resuspendowano, suspensja komórek czy stan basal.

Rozdział „**Wyniki**” Doktorantka rozpoczęła od opisanie otrzymanych modeli drożdżowych z dzikim typem oraz ze zmutowaną formą huntingtyny oraz z białkiem VDAC. Przy weryfikacji poziomu białek VDAC (zarówno yVDAC jak i hVDAC1/2/3) sugerowałabym umieszczenie również kontroli w postaci naniesionego na żel lizatu otrzymanego nie tylko z wyizolowanych mitochondriów, ale także z całych komórek. Chciałabym również zaznaczyć, że porównywanie różnic w poziomie białek VDAC w próbie z wyizolowanych mitochondriów, nie jest metodą ilościową Rys.14.

Wyniki są opisane poprawnie, ryciny są staranne, aczkolwiek w opisie wyników brakuje mi dokładnego opisanie o jaką wartość parametry maleją lub wzrastają (doktorantka używa sformułowań tego typu: „niewielkie zmniejszenie wartości tego parametru”, „istotne zmniejszenie wartości tych parametrów” itp.).

W tej części rozprawy można zauważyć trochę nieścisłości i niestaranności w:

1. opisach pod rysunkami
 - na rysunku 23 brakuje mi bezpośrednio pod rysunkiem dokładnego opisu (czytelnik musi szukać w tekście rozdziału i w opisie metod)
 - na rysunku 32 na osi Y powinno być podpisane ”Wskaźnik przeżywalności.....”
2. w użytych sformułowaniach (tylko dla przykładu podam te co najbardziej mi przeszkadzały)
 - „aktualne sprzężenie komórek” str. 107, chyba powinno być mitochondriów



- „szczurzy model” - badania przeprowadzano na modelu komórkowym (komórki PC12)
- nie użyłabym także sformułowania, że badano „parametry bioenergetyczne”, (badano tylko oddychanie/zużycie tlenu). Określenie „parametry bioenergetyczne” to jest trochę szersze pojęcie (np. pomiary potencjału na błonie mitochondrialnej, poziomu ATP czy aktywności łańcucha oddechowego)

Dyskusja jest napisana poprawnie. Umiejętnie dyskutuje Autorka swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe. Umieszczone na końcu szczegółowe wnioski, podsumowują co zostało zbadane.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest zredagowana w miarę staranny sposób, napisana w zasadzie poprawnym językiem. Doktorant jednak nie ustrzegł się szeregu drobnych błędów gramatycznych i stylistycznych czy literówek, które jednak nie wpłynęły na zrozumienie tekstu. Jedynie obowiązek recenzenta skłania mnie do zwrócenia uwagi na niewielkie uchybienia edytorsko-językowo-terminologiczne. Te najważniejsze omówione zostaną z Doktorantem osobiście. Pragnę jeszcze zaznaczyć, że w rozprawie doktorskiej powinno się używać terminów polskich i np. zamiast „matriks” powinno być „macierz”, „retikulum endoplazmatyczne” / „siateczka endoplazmatyczna”, itd. Jeszcze jedna uwaga dotyczy zbyt skąpej listy używanych skrótów, a w zaproponowanej liście skrótów przez Autorkę można znaleźć wiele błędów np. „Htt- natywna wersja huntingtyny” – to nie jest natywna wersja tylko dziki typ tego białka, „MAD-degradacja związana z mitochondriami” powinno być „Ścieżka regulująca/kontrolująca degradację”, NRF1/2 to po prostu czynniki transkrypcyjne. W rozprawie bardzo często, raz był używany skrót a raz pełna nazwa szczepów, co też trochę czyni bałagan i jest utrudnieniem dla czytelnika.

Praca jest zredagowana w sposób staranny, napisana w zasadzie poprawnym językiem. Doktorant jednak nie ustrzegł się szeregu drobnych błędów gramatycznych i stylistycznych czy literówek, które szczególnie nie wpłynęły na zrozumienie tekstu.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Darii Grobys ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę. Szczególnie cenne jest opracowanie modelu badawczego (drożdżowego) choroby Huntingtona ze szczególnym uwzględnieniem obecności białka VDAC (ludzkich izoform).



Poszczególne rozdziały są zwarte a główny cel badawczy znajduje w każdym z nich właściwe miejsce. Dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o dobrym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej, o umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także o znajomości rozległego piśmiennictwa w badanej dziedzinie i zdolności dyskusji własnych wyników badawczych w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań nad rolą mitochondriów w chorobie Huntingtona. Przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze, nie umniejszają pozytywnej oceny rozprawy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami. Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani Magister Darii Grobys do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez Nią stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

dr hab. Joanna Szczepanowska prof. nadzw