



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 9 sierpnia 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Małgorzaty Sekuły:
Morfogeneza i funkcja ciała Balbianiego w oocytach owadów o przeobrażeniu niepełnym
(Hemimetabola)**

Praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Sekuły powstała w Zakładzie Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem był prof. Szczepan Biliński.

Celem pracy było poznanie ultrastruktury oraz mechanizmów kontrolujących morfogenezę ciała Balbianiego (CB) w oocytach owadów, na przykładzie pięciu gatunków pasikoników oraz wyjaśnienie roli ciała Balbianiego w namnażaniu i eliminacji mitochondriów w oocytach owada. Te dwa główne cele zostały rozbite na szereg pytań, dotyczących szczegółowej analizy ciała Balbianiego podczas oogenezy. Obiekt badań to bardzo interesujący kompleks organelli, którego zarówno powstawanie jak i funkcje nie są jeszcze precyzyjnie poznane. Wiadomo, że pełni on istotną rolę w oocytach zarówno bezkręgowców jak i kręgowców. Jednak wiele aspektów jego funkcjonowania pozostaje enigmatycznymi. Doktorantka, wykorzystując różne gatunki pasikoników, zadała sobie pytanie o regulację struktury i funkcji CB. Muszę przyznać, że historia przedstawiona w doktoracie nie tylko jest spójna, ale też bardzo ciekawa dla biologa rozwoju zwierząt a pytania są ważne nie tylko dla zrozumienia oogenezy bezkręgowców, ale także kręgowców.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 140 stron, z czego *Wprowadzenie* stanowi 14 stron, *Materiały i metody* 10 stron, *Wyniki* 13 stron (bez ilustracji fotograficznych), *Dyskusja* 9 stron. Ponadto, praca zawiera 32 tablice z *Dokumentacją fotograficzną*, *Spis treści*, *Wykaz rysunków, tabel i wykresów*, *Wykaz rycin*, wymagane *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Podsumowanie i wnioski*, *Bibliografię* (114 pozycji). Doktorantka, umieściła w niej także wykaz projektów, którymi kierowała (3).

W pierwszej części *Wprowadzenia* Autorka przedstawia budowę i klasyfikację jajników owadów oraz omawia oogenezę. Kolejna część dotyczy mitochondriów oraz budowy i funkcji ciała Balbianiego,

zarówno u owadów jak i innych organizmów. O ile fuzja i podział mitochondriów zostały przedstawione wystarczająco szczegółowo to dosyć pobieżnie opisany został proces autofagii tych organelli. Ostatni, bardzo krótki fragment, przedstawia pasikonikowate, a więc owady, które zostały wybrane jako dawcy oocytów do prowadzonych badań. Argumentacja, dlaczego właśnie te owady wybrano została umieszczona w *Materiałach i metodach* - mogłaby jednak znaleźć się we *Wprowadzeniu*, nieco jej brakowało. *Wprowadzenie*, mimo że czasem zbyt zwięzłe, o czym wspomniałam powyżej, zawiera informacje wystarczające dla zrozumienia realizowanego projektu, świadczy też o dużej wiedzy Autorki, i umiejętności przekazania najbardziej istotnych informacji w przystępny sposób. Co istotne, ta część pracy ilustrowana bardzo dobrymi schematami.

Materiały i metody zostały przygotowane w sposób precyzyjny i nie budziły moich większych wątpliwości. Cele doktoratu mgr Małgorzata Sekuła zrealizowała przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych analiz, podczas których wykorzystwała hodowlę owadów, mikroskopię świetlną i elektronową, barwienie skrawków, immunodetekcję wybranych antygenów, analizy aktywności mitochondriów, analizy replikacji DNA, hydrydyzację in situ. Ponadto, stosowała różnego rodzaju inhibitory, pozwalające jej na badanie ciała Balbianiego oraz dokonywała trójwymiarowych rekonstrukcji tej struktury. Tabele podsumowały wykorzystane odczynniki. W przypadku opisu immunodekacji wybranych antygenów Doktorantka opisała jakie kontrole barwień wykonała. Takiej informacji zabrakło w rozdziale dotyczącym wykorzystania BrdU oraz opisie hydrydyzacji in situ. Zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło Doktorantce na doskonale opanowanie warsztatu naukowca.

Opis *Wyników* podzielony został na podrozdziały. Zaczyna się od przedstawienia badanych pasikoników oraz charakterystyki budowy ich jajników. Ryc. 1 przedstawia nam całą gonadę *Conocephalus fuscus*, wczesno i późnowitellogeniczny pęcherzyk jajnikowy *Meconemia meridionale* oraz późnowitellogeniczny pęcherzy jajnikowy *Metrioptera brachypetra*, jako wybranych przykładów obiektów badawczych. Kolejne ryciny skupiają się na ciele Balbianiego i świetnie dokumentują różnice w jego morfologii i lokalizacji elementów tej struktury, zarówno na preparatach analizowanych w mikroskopie świetlnym jak i TEM. Doktorantka przeprowadziła także pomiary granul, ale przede wszystkim skupiła się na analizie mitochondriów, jako istotnych składników ciała Balbianiego (Tabele 4,5, Wykres 1, 2). W przypadku tych pomiarów, ale także i kolejnych analiz, w tabelach i na wykresach, zabrakło informacji ile oocytów przeanalizowano. Niektóre z rycin zawierają natomiast informacje ile skrawków zbadana, bez podania liczby oocytów. O ile oocyty badanych gatunków różniły się liczbą mitochondriów to proporcje ich podklas były podobne.

Kluczową część pracy stanowi ta opisująca morfogenezę ciała Balbianiego u wybranego, "modelowego", pasikonika - *Meconemia meridionale*, u którego elementy CB można łatwo zidentyfikować, tworzą wyraźny półksiężyc na jednym z biegunów jądra oocytu. Świetnej jakości zdjęcia preparatów TEM oraz bardzo dobre i poglądowe trójwymiarowe rekonstrukcje ułatwiają zwizualizować dynamikę zachodzących zmian. Być może warto byłoby na ich podstawie stworzyć schemat pokazujący zmiany

w organizacji CB w kolejnych fazach dojrzewania mejotycznego oocytu? Kolejne etapy badań dotyczyły określenia aktywności mitochondriów, udziału białek nieuporządkowanych w formowaniu CB, roli mikrotubul, dynamiki mitochondriów i czynników, które ją regulują. Analizy te obejmowały manipulację elementami cytoszkieletu komórki czy precyzyjne lokalizacje ich składników. W efekcie Doktorantka uzyskuje klarowny obraz zachodzących zmian. Wykazała, że u pasikoników mitochondria tworzą sieć, w obrębie której dochodzi do powstawania i eliminacji tych organelli. Badając białko Drp1 udowodniła, że jego rozmieszczenie zależy od mikrotubul, co może mieć wpływ na powstawanie mitochondriów. Co istotne wadliwie funkcjonujące mitochondria po oddzieleniu od CB ulegają mitofagii. Analizując powstawanie ciała Balbianiego, Doktorantka wykazała także, że struktury te wykazują homologię do CB innych bezkręgowców ale także kręgowców. Tak więc, przeprowadzone analizy były bardzo szerokie i doprowadziły do spójnych wniosków.

Dokumentacja *Wyników* jest bardzo dobra. Jednak, brakuje w niej, o czym już wspomniałam, danych na temat liczby analizowanych oocytów. Ponadto, pewną niedogodność w analizie wyników sprawiało to, że kontrole często przedstawiane były na innych rycinach (np. ryciny 19 i 20 mogłyby być połączone), lub wykonane były innymi technikami badawczymi. Tak było w przypadku analizy wykorzystującej PROTEOSTAT (Ryc. 18). Czy wykonano podobne barwienia w oocytach traktowanych 1,6-hexanodolem? Trudno jest porównywać te preparaty z tymi analizowanymi przy użyciu TEM. Pytanie o odpowiednie kontrole dotyczy także analiz z wykorzystaniem BrdU. Czy wykonano barwienie kontrolne skrawków oocytów nieinkubowanych w obecności BrdU? Jak można wytłumaczyć bardzo słabe nakładanie się sygnału detekcji DNA (DAPI) i immunodetekcji BrDU?

Podsumowując, Doktorantce udało się precyzyjnie, wykorzystując odpowiednio dobrane techniki, scharakteryzować morfogenezę i funkcje ciała Balbianiego pasikonika. Wyjaśniła ona mechanizmy leżące u podłoża regulacji dynamiki mitochondriów. Wyniki te są nowatorskie, bardzo dobrze udokumentowane.

W związku z *Dyskusją* uzyskane dane zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Mgr Małgorzata Sekuła krytycznie podeszła do efektów swojej pracy i obficie się do nich odwołując ułożyła je na tle prac innych badaczy. Lekturę świetnie wspierały schematy podsumowujące uzyskane dane, z rozbiciem na poszczególne aspekty fenotypu badanych komórek. *Podsumowanie i wnioski* świetnie streściły meritum pracy ale także odpowiedziały na postawione już w streszczeniu pracy pytanie "czy funkcje ciała Balbianiego opisane z wykorzystaniem organizmów modelowych są uniwersalne dla całego królestwa zwierząt, czy specyficzne tylko dla określonej grupy organizmów?". Doktorantka zwróciła bowiem uwagę na pierwotną ewolucyjnie funkcję ciała Balbianiego, jaką jest kontrola liczby i jakości mitochondriów w oocytach.

Rozprawa doktorska napisana jest bardzo dobrym językiem. Czytało się ją bardzo dobrze. Ryciny, schematy, wykresy zostały starannie przygotowane. Wszystkie fotografie i rekonstrukcje 3D były doskonałej jakości.

Podsumowując, pani mgr Małgorzata Sekuła zrealizowała wszystkie postawione cele. Precyzyjnie opisała powstawania i funkcje ciała Balbianiego u owadów, na przykładzie pasikoników. Przeprowadzone badania są nowatorskie. Tak więc, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponieważ wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane co najmniej w dwóch publikacjach (Sekula et al., 2022, Zoology; Sekula et al. 2020, J. Morphol) wnoszę o wyróżnienie doktoratu stosowną nagrodą.

Maria Anna
Ciemerych-
Litwinienko;
Uniwersytet
Warszawski

Elektronicznie
podpisany przez
Maria Anna
Ciemerych-
Litwinienko;
Uniwersytet
Warszawski
Data: 2023.08.09
15:12:24 +02'00'