



Oceny rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Sekuły

*pt.: Morfogeneza i funkcja ciała Balbianiego w oocytach owadów o przeobrażeniu niepełnym
(Hemimetabola)*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Sekuły wykonana została w Zakładzie Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Promotorem dysertacji jest prof. dr hab. Szczepan Biliński, specjalista w dziedzinie biologii rozwoju i biologii komórki, w tym wieloletni badacz struktury i funkcji ciała Balbianiego w oocytach bezkręgowców i kręgowców.

Historia badań struktury oraz funkcji ciała Balbianiego, tak jak przedstawiła Doktorantka w rozdziale *Wstęp*, sięga późnych lat XIX wieku, kiedy to francuski naukowiec Balbiani opisał tę strukturę w oocytach pajaków i wijów. Kolejne badania przeprowadzone w zeszłym i obecnym stuleciu pozwoliły na znalezienie podobnych struktur w oocytach muszki owocowej, ryb, płazów, myszy oraz człowieka. Prowadzone były również liczne badania, dzięki którym poznano budowę ultrastrukturalną ciała Balbianiego, stanowiącego nieobłoniony kompleks organelli. Natomiast zastosowanie technik biologii molekularnej ukazały komponenty tej struktury na poziomie kwasów nukleinowych oraz białek. Pomimo wiedzy dotyczącej budowy oraz morfogenezy ciała Balbianiego, przede wszystkim u gatunków modelowych bezkręgowców i kręgowców, funkcje tej struktury nie zostały dostatecznie poznane.

Projekt badawczy Pani magister skupiał się na zagadnieniach związanych z badaniami morfogenezy oraz funkcji ciała Balbianiego w oocytach gatunków nie modelowych owadów o przeobrażeniu niepełnym, jakimi są pasikonikowate z rodziny owadów prostoskrzydłych. Celem pracy Pani mgr Sekuły było poznanie ultrastruktury oraz mechanizmów kontrolujących morfogenezę ciała Balbianiego w oocytach pięciu gatunków owadów ze szczególnym uwzględnieniem roli ciała Balbianiego w namnażaniu i selektywnej eliminacji mitochondriów nieprawidłowych w oocytach badanych gatunków.

Badania prowadzone przez Doktorantkę finansowane były przez NCN w ramach projektu Preludium 20 oraz przez Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w ramach dofinansowania działalności naukowej doktorantów, w latach 2019 – 2020. Doktorantka jest również współautorem dwóch prac przeglądowych oraz dwóch oryginalnych publikacji z listy JCR.



Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim. Manuskrypt, wraz ze streszczeniem, piśmiennictwem i dokumentacją fotograficzną liczy 140 stron tekstu. Podział pracy na rozdziały i podrozdziały jest prawidłowy i w pełni spełnia kryteria stawiane oryginalnym pracom naukowym. Opis skomplikowanych procesów wyjaśniających zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej oraz uzyskane wyniki, Autorka pracy przedstawiła w licznych tabelach, wykresach i rycinach. Dokumentacja wyników zasługuje na wyróżnienie. Wszystkie ryciny są czytelne i przejrzyste opisane.

Rozdział *Wprowadzenie* zawiera precyzyjnie dobrane podrozdziały wprowadzające czytelnika w zagadnienia poruszane w projekcie badawczym. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka we *Wprowadzeniu* bardzo „ważyla” podane informacje. Dzięki temu czytelnik mógł się skupić na najważniejszych zagadnieniach i nie był rozprasany mniej istotnymi informacjami. Oznacza to, że Pani magister była merytorycznie bardzo dobrze przygotowana do projektu doktorskiego.

Przystępując do realizacji projektu Doktorantka założyła główne cele oraz szczegółowe pytania badawcze, na które, dzięki zastosowaniu licznych metod, stopniowo odpowiadała.

Doktorantka w rozdziale *Materiały* wyjaśnia powody użycia do badań pięciu gatunków z rodziny pasikonikowatych, podkreślając ich zalety ze względu na rodzaj jajnika (typ panoistyczny), obecność oocytów z wyraźnym ciałem Balbianiego oraz jednolitej ooplazmy wykazującej brak plazmy płciowej. Świadczy to o świadomym wyborze przez Doktorantkę materiału do badań. W rozdziale tym pojawia się również kolejny argument przemawiający za wyborem do badań gatunków z rodziny Tettigoniidae, rodziny będącej jedną z bazalnych taksonów owadów. Uzasadnienia wyboru zostały opisane w rozdziale II.1.2 (*Materiały*). Kolejne rozdziały dotyczą metod badawczych, dzięki którym Doktorantka uzyskała oryginalne wyniki. Ta część rozprawy napisana jest z dużą starannością. Doktorantka zastosowała szeroką gamę metod takich jak: mikroskopia świetlna i konfokalna, TEM, histochemia, immunocytochemia, hybrydyzacja *in situ* oraz techniki morfometryczne. Analizy ilościowe zostały opracowane statystycznie i zobrazowane wykresami. Wysoka jakość załączonej dokumentacji jednoznacznie wskazuje na uzyskaną przez Doktorantkę biegłość w stosowanych metodach i korzystaniu z aparatury badawczej.

W pierwszym etapie realizacji projektu doktorskiego Pani magister przeprowadziła porównawczą analizę budowy jajnika i owarioli pięciu gatunków Tettigoniidae. Badania wykazały, że jajniki badanych gatunków wykazują wysokie podobieństwa w budowie. Każdy z jajników zbudowany jest 20 do 30 owarioli panoistycznych. W badaniach ultrastrukturalnych wykazano, że ciało Balbianiego wszystkich ujętych w badaniach gatunków zawiera klasyczną komponentę organelli komórkowych. Różnice dotyczą kształtu i rozmieszczenia agregatów materiału nuage. Natomiast, cechą wspólną zaobserwowaną u wszystkich badanych gatunków jest występowanie kompleksów mitochondria-materiał nuage, w różnych konfiguracjach. Doktorantka przeprowadziła analizy ilościowe dotyczące liczby mitochondriów występujących w sąsiedztwie lub bezpośrednim kontakcie materiału nuage. Zaobserwowała również w karioplazmie badanych gatunków Tettigoniidae występowanie elektronowo gęstych ziaren. Ziarna te zaobserwowane były zawsze w tej części otoczki jądrowej, która od strony cytoplazmy kontaktowała się z agregatami materiału nuage. Autorka pracy określając je mianem „ziarna prenuage” sugeruje, że ziarnistości te uczestniczą w tworzeniu materiału nuage. Ponadto, aby uzyskać odpowiedzi na szczegółowe pytania zawarte w celu pracy Doktorantka wykonała dodatkowe badania. Badanie te wykonano z zastosowaniem jednego gatunku (*M. meridionale*), którego hodowlę Doktorantka prowadziła w warunkach laboratoryjnych. Badania dowiodły, że u badanego gatunku ciało Balbianiego powstaje w profazie I podziału mejotycznego. Analiza rekonstrukcji trójwymiarowych na poziomie TEM wykazała, że mitochondria ciała Balbianiego, podobnie jak w komórkach somatycznych, tworzą rozbudowaną sieć zarówno w oocytach mejotycznych jak i wczesno-prewitelogenicznych. Ponadto, mitochondria, które nie posiadały kontaktu z materiałem nuage, często sąsiadowały z organellami lizosomopodobnymi. Aktywność mitochondriów w oocytach badano stosując Mitotracer Deep red. Wynik tego testu był następnie analizowany za pomocą programu ImageJ. Wyniki badań, gdzie Doktorantka obliczyła skorygowaną fluorescencję całkowitą wskazują, że aktywność mitochondriów w sieci jest wyższa od mitochondriów usytuowanych poza siecią. Test PROTEOSTAT użyto w celu wykazania agregatów białek inherentnie nieuporządkowanych w oocytach *M. meridionale*. Badania te potwierdziły, że białka te zaangażowane są, podobnie jak u kręgowców, w biogenezę ciała Balbianiego. Wykonano również ekstrakcję cytoszkieletu aby potwierdzić ewentualny udział tej struktury w tworzeniu ciała Balbianiego. Replikację mtDNA potwierdzono przy zastosowaniu metody BrdU. Znaczenie mikrofilamentów w podziale mitochondriów wykazano inkubując jajniki w medium Grace'a



z dodatkiem cytochalazyny B. Natomiast potraktowanie oocytów kolchicyną ujawniło, że za równomierne rozmieszczenie Drp1 mRNA odpowiedzialne są mikrotubule. Wnikliwa analiza obrazów wykonanych w TEM oraz rekonstrukcji trójwymiarowych wykazała obecność, w oocytach prewitelogenicznych, licznych organelli związanych z procesem autofagii. Na podstawie tych obserwacji Doktorantka zastosowała w badaniach testy immunofluorescencyjne na obecność markerów autofagii: anti-ATG5 oraz anti-LC3. Dzięki tym testom Autorka pracy wykazała, że na obszarze ciała Balbianiego *M. meridionale* zachodzi proces autofagii/mitofagii.

Prawidłowo i jasno wyznaczony cel pracy oraz właściwie zastosowane szerokiego wachlarza technik badawczych pozwoliły Doktorantce na uzyskanie interesujących wyników o wartości poznawczej. W przedstawionej do recenzji pracy do najważniejszych osiągnięć stanowiących o walorach naukowych pracy mgr Małgorzaty Sekuły zaliczyć należy:

1. Mitochondria ciała Balbianiego tworzą dynamiczną sieć, będącą miejscem namnażania prawidłowych mitochondriów oraz miejscem selektywnej eliminacji mitochondriów nieprawidłowych.
2. Mitochondria niefunkcjonalne po oddzieleniu od sieci ulegają mitofagii.
3. Morfogeneza ciała Balbianiego, podobnie jak to zostało zaobserwowane u kręgowców, zainicjowana jest poprzez samoagregację białek inherentnie nieuporządkowanych (IDPs).
4. Za równomierne rozmieszczenie Drp1 mRNA w ooplazmie oocytów odpowiedzialny jest cytoszkielet mikrotubularny, co z kolei zapewnia synchronizację podziałów mitochondrialnych w różnych regionach ooplazmy.

Wniosek końcowy przedstawiony przez Autorkę projektu doktorskiego podsumowuje wszystkie wyniki uzyskane w dysertacji. Doktorantka sugeruje, że pierwotną funkcją ciała Balbianiego jest namnażanie oraz eliminacja mitochondriów nieprawidłowych. Pozostałe funkcje (np. ukierunkowany transport organelli, makrocząstek oraz udział w lipidogenezie), według Autorki wyewoluowały wtórnie i funkcje te są ewolucyjnie „młodsze”.

W ostatnim rozdziale *Dyskusja* Autorka rozprawy podsumowuje wszystkie wyniki uzyskane podczas realizacji projektu doktorskiego, wyciągając wnioski końcowe. W *Dyskusji* zawarte zostały wszystkie zagadnienia, które Autorka ujęła w celach pracy i właściwie zinterpretowała w oparciu o dostępną literaturę.

Pytania i uwagi:

- 1. Aby przygotować specyficzne sondy oligonukleotydowe potrzebna była znajomość sekwencji genu Drp1. Na podstawie sekwencji genów jakich gatunków zostały przygotowane sondy? Zastosowała Pani krótkie sekwencje sond do badań, czy miało to na celu wzmocnienie sygnału? Ponieważ białko Drp1 występuje w izoformach (ok. siedmiu), czy ma Pani pewność, że sondy te należą do tej samej izoformy Drp1?*
- 2. Przeprowadziła Pani badania ekspresji Drp1 mRNA metodą hybrydyzacji in situ. Analizowała Pani również, w mikroskopie konfokalnym, obecność tego białka w różnych fazach oogenezy używając króliczego przeciwciała ant-Drp1. „Wisienką na torcie” było by użycie techniki Western blot, na wykazanie obecności badanego białka w różnych fazach oogenezy. Dobrze byłoby również przeanalizować poziom białka Drp1 w różnych etapach oogenezy.*
- 3. Kolejnym ciekawym wynikiem uzyskanym przez Panią jest wykazanie obecności Drp1 mRNA na obszarze karioplazmy, w miejscu występowania materiału prenuage. W dużym uproszczeniu, świadczyć to może, że materiał ten zaangażowany jest w podział mitochondriów. Czy znane są jeszcze inne komponenty materiału nuage, które mogły by mieć wpływ na podział czy fuzję mitochondriów?*
- 4. Przy pomocy programu ImageJ obliczono skorygowaną fluorescencję całkowitą (CTCF) mitochondriów w mikrosieci oraz poza nią. Stwierdziła Pani, że potencjał błonowy jest wyższy w mitochondriach tworzących sieć aniżeli w mitochondriach poza nią. Pomiary dokonane były z 8 skrawków jednego oocytu, czy kilku oocytów? Sądzę, że do opracowań statystycznych powinno się trzymać zasady przynajmniej $n=3$ (n =liczba powtórzeń). Czy parametry lasera były jednakowe w każdym przypadku i jak je Pani ustalała? Dookoła mitochondriów tworzących sieć znajdują się również, w dużej liczbie, pojedyncze mitochondria o podobnym potencjale błonowym. Jak ta grupa pojedynczych mitochondriów była liczona w stosunku do mitochondriów w sieci? Proszę o omówienie tej procedury w szczegółach.*
- 5. Pomimo tego, że w dyskusji zawarte są wszystkie informacje potwierdzające sugestię, że pierwotną funkcją ciała Balbianiego jest namnażanie oraz eliminacja mitochondriów nieprawidłowych, sądzą jednak, że powinna być Pani poświęcić jeden oddzielny rozdział na omówienie tego zagadnienia. Chciałbym również zapytać się Pani, jak przedstawia się sytuacja badań ciała Balbianiego u przedstawicieli innych rzędów Hemimetabola i innych grup bezkręgowców?*



6. *W jaki sposób skontrolowała Pani specyficzność przeciwciał pierwszorzędowych?*
7. *Sądzę, że włączenie dokumentacji fotograficznej, która znajduje się na końcu dysertacji, do rozdziału Wyniki, znacząco ułatwiłoby pracę recenzentowi.*
8. *Co rozumie Pani pod pojęciem „cząsteczki cytoplazmy” (Dyskusja, str. 60, podrozdział Rozpraszanie ciała Balbianiego)*

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr mieści się w obszarze badań podstawowych i jest precyzyjnym opracowaniem morfogenezy i funkcji ciała Balbianiego u przedstawicieli blisko ze sobą spokrewnionych pasikonikowatych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka zasugerowała nową funkcję ciała Balbianiego w oocytach pasikonikowatych, polegającą na selektywnym przekazywaniu prawidłowych mitochondriów do komórek organizmów potomnych. Dzięki bardzo dobremu opanowaniu warsztatu badawczego Doktorantka w pełni zrealizowała cele postawione w pracy. Uzyskane przez Autorkę wyniki są oryginalne i dobrze udokumentowane a dyskusja jest wnikliwa i wszechstronna.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Sekuły pt. *Morfogeneza i funkcja ciała Balbianiego w oocytach owadów o przeobrażeniu niezupełnym (Hemimetabola)*, spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz.1668 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Sekuły do dalszych etapów rozprawy doktorskiej. Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny o nadanie Pani magister stopnia naukowego doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne*. Mając na względzie omówione powyżej osiągnięcia, wiedzę i umiejętności Doktorantki oraz ogromny wysiłek, który włożyła do wykonania badań, wnioskuję do Rady Dyscypliny o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Sekuły.

Wrocław, 01. 08. 2023 r.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Małgorzata Daczewska