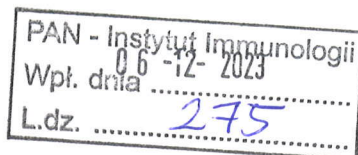


**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii



Wrocław, 04.12.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Michała Zalasa**pod tytułem****“Ocena fenotypowa myszy niosących mutację punktową genu alfa-II spektryny
jako modelu zwierzęcego dla zespołu ataktycznych spektrynopatii
neuronalnych”****zrealizowanej w Laboratorium Immunologii Nowotworów Instytut Immunologii
i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk****pod kierunkiem Promotora prof. dr. hab. Arkadiusza Miążka**

Chociaż od chwili odkrycia spektryn jako białek budujących tzw. szkielet błonowy minęło ponad pół wieku, wiedza na temat ich roli w różnych procesach fizjologicznych wciąż jest niepełna. Powszechnie występujący w komórkach zwierzęcych szkielet spektrynowy obecnie postrzegany jest jako centralny element łączący błony komórkowe ze strukturami cytoplazmatycznymi poprzez jednoczesne wiązanie integralnych białek błonowych oraz lipidów, jak również innych białek wewnątrzkomórkowych, bezpośrednio bądź za pośrednictwem białek adaptorowych. Spektryny tworzą swoiste rusztowanie dla kompleksów błonowych, wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych, pęcherzyków wydzielniczych oraz elementów cytoszkieletu definiując strukturę mozaikową równomiernie ułożonych elementów składowych. Za sprawą inherentnej elastyczności strukturalnej i funkcjonalnej spektryn owa mozaika może tworzyć w błonie dynamiczne klustery receptorowe czy też struktury mikrodomenowe. Szczególnie sugestywne w tym kontekście są obserwacje dotyczące oddziaływania spektryny z tzw. tratwami lipidowymi błon różnego rodzaju komórek, przy czym rola fizjologiczna tego typu interakcji wciąż pozostaje kwestią nie do końca wyjaśnioną. Zidentyfikowano wiele przypadków neuropatii



spektrynozależnych, gdzie mutacje w genie *SPTAN1* kodującym alfa-II spektrynę skorelowano z występowaniem m.in. wczesnych niemowlęcych encefalopatii padaczkowych, zespołu Westa oraz dziedzicznych neuropatii ruchowych. Znamienne, iż w ogromnej większości przypadków spektrynopathie pozostają odporne na leczenie farmakologiczne. Odmiana tego stanu rzeczy jest obecnie znacząco utrudniona ze względu na ograniczone możliwości kompleksowej oceny roli alfa-II spektryny w patogenezie spektrynopathie i testowania nowych terapii w modelach zwierzęcych ze względu na niedobór modeli reprezentujących kolejne stadia życia osobniczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska znacząco rozszerza horyzonty badawcze w tym zakresie. Jej Autor zmierzył się z zadaniem polegającym na opisie fenotypowym myszy niosących mutację punktową genu *SPTAN1* skutkującą substytucją R1098Q w sekwencji aminokwasowej alfa-II spektryny. Zwierzęta te rozważane były jako model spektrynozależnych ataksji mózdkowych, który mógłby posłużyć do badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za spektrynozależne neuropatie przez cały okres życia osobniczego i dodatkowo pozwoliłyby rozwijać nowe podejścia terapeutyczne. W macierzystym zespole już wcześniej zainicjowano badania, których wyniki wskazywały, że myszy obarczone wspomnianą mutacją mogą być unikalnym modelem zwierzęcym przejawiającym fenotyp napadów spazmów oraz zaburzeń motorycznych i pamięciowych, należących do spektrum objawów klinicznych pacjentów cierpiących na neuropatie spektrynozależne. Badania przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego pozwoliły na dogłębne scharakteryzowanie tego modelu i wykazanie występowania deficytów motorycznych i pamięciowych oraz opis innych zmian morfometrycznych i fizjologicznych. Chociaż założenia i cele pracy wynikają z treści dysertacji to jednak szkoda, że nie zostały one bardziej precyzyjnie sformułowane w postaci osobnego rozdziału lub akapitu. Pozwoliłoby to czytelnikowi odpowiednio ulokować opisane w pracy badania w kontekście szerszej charakterystyki wspomnianego mutantu dokonanej przez innych członków macierzystej grupy badawczej. Niemniej, podjęte przez Doktoranta prace eksperymentalne bardzo dobrze wpisują się w ten kontekst, a przebieg tych prac wytyczony został w sposób bardzo racjonalny i konsekwentny. To pozwoliło uzyskać interesujące i wartościowe wyniki, które znacząco przyczyniają się do zbudowania pełniejszego obrazu wspomnianego modelu zwierzęcego i potwierdzenia jego użyteczności w dalszych badaniach.



Mgr Michał Zalas przedstawił swoje osiągnięcia naukowe w formie rozprawy doktorskiej o klasycznym układzie. Należy jednak podkreślić, że duża część przedstawionej w niej wyników została już wcześniej ujawniona w postaci dwóch publikacji w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu oraz wysokim współczynnikiem oddziaływania, co zostało odnotowane na s. 3 dysertacji. W szczególności druga z wymienionych prac (opublikowana w *Brain Sciences* w 2023 roku) obfituje w wyniki, które odnaleźć można także w pracy doktorskiej. Nieco zaskakujący jest fakt, iż odnośnik do tej publikacji pojawia się tylko raz w tekście dysertacji. Dorobek publikacyjny Doktoranta obejmuje także współautorstwo innego ściśle powiązanego tematycznie artykułu eksperymentalnego, który został opublikowany na łamach *Biochemical and Biophysical Research Communications* (DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.021). Pomimo krótkiego czasu od ukazania się tych prac zostały one już zauważone w środowisku naukowym, na co wskazuje sumaryczna ilość cytowań wynosząca 8 (wg bazy Scopus bez autocytowań na dzień sporządzenia recenzji).

Meritum rozprawy doktorskiej w sposób jednoznaczny ma odzwierciedlenie w tytule, a zaprezentowane zostało w języku polskim na przestrzeni pięciu głównych rozdziałów. Na niespełna 150 stronach dysertacji odnaleźć można logicznie zorganizowane treści obejmujące także streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, spis rycin i tabel jak również zestawienie źródeł literaturowych zawierające w sumie 119 pozycji. Układ pracy jest przejrzysty, co ułatwia odbiór i płynne przechodzenie od informacji ogólnych do tych bardziej szczegółowych.

Pierwszą z głównych części pracy doktorskiej jest „wprowadzenie”. Stanowi ona przykład dość obszernego podsumowania zgromadzonej dotychczas wiedzy, co sprzyja zrozumieniu całości pracy i umiejscowieniu prezentowanych w dalszych częściach wyników w odpowiednim kontekście. Bardzo trafnym posunięciem było rozdzielenie tego fragmentu na cztery podrozdziały, w których kolejno przedstawione są zagadnienia dotyczące struktury i funkcji spektryn, ludzkich spektrynopatii oraz modeli zwierzęcych odzwierciedlających ludzkie spektrynopatie, w szczególności tych dotyczących alfa-II spektryny. Generalnie, wstęp jest napisany w sposób rzeczowy i interesujący, chociaż siłę przekazu można było zwielokrotnić poprzez wzbogacenie tekstu rycinami. Całkowita rezygnacja Autora z tej formy przekazu w pierwszej części dysertacji jest nieco zaskakująca. Rozdział ten na ogół cechuje konsekwencja i dyscyplina, ale w niektórych miejscach pojawiają się wyjątki polegające na zbytym odbieganiu od meritum (np. trzy



ostatnie akapity r. 1.2.5, ostatni akapit na s.64 w kontekście całego r. 1.4, itp.). Na przestrzeni tej części dysertacji można odnaleźć także kilka drobnych, aczkolwiek istotnych nieścisłości takich jak błędne zdefiniowanie rejonów spektryn alfa i beta odpowiedzialnych za heterodimeryzację (s. 20), błędne zakwalifikowanie MPP-1 do białek transmembranowych (s. 32) oraz kilka nie do końca trafnych sformułowań jak na przykład „SPTAN1 jest obecny w OHC” (co jest oczywiste, być może Autorowi chodziło o ekspresję tego genu; s.27) czy też „geny chorobotwórcze” (s. 47; geny, szczególnie w odniesieniu do własnych genów gospodarza, nie wywołują choroby). Recenzent uważa także za zasadne rozróżnienie funkcjonalne i strukturalne cytoszkieletu (zbudowanego głównie z mikrofilamentów, mikrotubul i filamentów pośrednich) od szkieletu błonowego (tworzonego m.in. przez spektryny) (por. s. 25).

Następna część dotyczy już badań przeprowadzonych przez Doktoranta, a otwiera ją opis użytych materiałów i metod. Ten fragment przygotowany jest w sposób przejrzysty i logiczny, przy czym uwagę zwraca dbałość o zachowanie szczegółowości niezbędnej do zagwarantowania pełnej odtwarzalności opisywanych procedur eksperymentalnych. Kilka kwestii wymaga jednak dodatkowych wyjaśnień. Przykładowo, w tabeli 2 nie zamieszczono wartości pH niektórych buforów. Nie jest też jasne czym różni się „H₂O MQ” od „H₂O dest”. Nie przedstawiono też szczegółów procedury „wysrebrzenia” żeli poliakrylamidowych wspomnianej w r. 2.2.12.

Punktem kulminacyjnym rozprawy doktorskiej jest obszerna część obejmująca opis uzyskanych wyników. W pierwszej kolejności Autor skoncentrował się na zdefiniowaniu sposobu dziedziczenia mutacji R1098Q, opisie fenotypowym myszy oraz szczegółowej charakterystyce morfometrycznej myszy heterozygotycznych względem wspomnianej mutacji. Wyniki jednoznacznie wskazują na istotne statystycznie różnice w porównaniu do myszy o genotypie dzikim. W odniesieniu do analizy morfometrycznej pewne wątpliwości wzbudza jedynie sposób prezentowania stosunku masy śledziony do wagi myszy (s. 91-92 i ryc. 14B) ze względu na bardzo wysokie wartości uzyskanych współczynników. W toku dalszych badań Doktorant oszacował poziom alfa-II i beta-III spektryny i białka GFAP w lizatach mózgowych myszy obciążonych mutacją. Szkoda, że zasadność analizy ostatniego z wymienionych białek nie została przedstawiona bezpośrednio przy opisie eksperymentu (podobnie jak w przypadku beta-III spektryny), a dopiero w następnym rozdziale. Najcenniejszą częścią wynikową wydają się być dane uzyskane na drodze szeregu rozbudowanych eksperymentów, które doprowadziły do wskazania występowania



deficytów motorycznych i pamięciowych u badanych zwierząt. Doktorant trafnie konkluduje, że fenotyp myszy obarczonych wspomnianą mutacją w dużym stopniu odwzorowuje spektrum kliniczne zaburzeń motorycznych, pamięciowych i rozwojowych występujących u pacjentów z dominującymi mutacjami genu kodującego alfa-II spektrynę. Dalsze badania pozwoliły także ustalić, że zidentyfikowane anomalie wielkości śledziony oraz ubytek liczby leukocytów i limfocytów krwi obwodowej badanych myszy nie wpływa znacząco na funkcję układu odporności wrodzonej i nabytej. Co więcej, zmiany w poziomie wydzielania niektórych czynników proangiogennych przez pierwotne fibroblasty płodowe myszy obarczonych mutacją oraz częściowe zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁ i obniżenie ilości komórek w fazie G₂/M mogą być skorelowane z występowaniem krwotoków obserwowanych w rozwoju zarodkowym. Wszystkie te konkluzje oparte są o dobrze udokumentowane i na ogół właściwie opracowane wyniki cząstkowe. Jedynie w przypadku danych przedstawionych na ryc. 27 brakuje jasności co do ilości powtórzeń biologicznych eksperymentu, a przy interpretacji wpływu mutacji na cykl komórkowy pomocna byłaby prezentacja surowych danych cytometrycznych.

W rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” znajduje się dalsza ocena analizowanego w pracy modelu mysiego wzbogacona wnikliwą eksploracją dostępnej literatury. Próby wyjaśnienia związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy cechami fenotypowymi myszy obarczonych mutacją R1098Q a potencjalnym podłożem molekularnym tych zmian są tu konfrontowane z potencjałem proponowanego modelu zarówno w badaniach poznawczych jak i aplikacyjnych. Ta część wraz z przedstawionymi w ostatnim rozdziale wnioskami bardzo dobrze współgra z poprzednimi rozdziałami i sprawia, że całość dysertacji staje się kompletna. Jest to w dużej mierze także zasługa spójności logicznej i umiejętności prawidłowego komponowania wyводу naukowego. Pozwala to na bardzo dobrą ocenę wagi poczynionych obserwacji i utwierdza w przekonaniu, że dokonania Doktoranta mają znaczący wpływ na rozwój reprezentowanej dziedziny naukowej. Niemniej, analiza opisanych w dysertacji dokonań skłania do sformułowania kilku pytań, które zasługują na dogłębną dyskusję.

1. Czy Doktorant byłby skłonny wysnuć alternatywne hipotezy odnoszące się do obserwowanego spadku liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej, pokrywającego się z tendencją obserwowaną w śledzionach badanych myszy, lecz nie odzwierciedlonego w zmianach funkcji układu odporności wrodzonej i nabytej? Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tych obserwacji z pewnością wymaga



dalszych badań, w oczywisty sposób wykraczających poza ramy pojedynczego projektu doktorskiego, ale być może Doktorant ma już pewne pomysły na rozwiązanie tej zagadki?

2. W jaki sposób mutacja R1098Q mogłaby wpływać na stabilność strukturalną alfa-II spektryny? W publikacji z 2021 zespół, którego częścią był Doktorant opisuje wyniki symulacji dynamiki molekularnej wskazujące na zwiększoną elastyczność cząsteczki obciążonej mutacją oraz jej zwiększoną podatność na proteolizę za pośrednictwem kalpajny przy osłabionej zdolności wiązania kalmoduliny. Czy istnieją dodatkowe dane dotyczące wpływu mutacji na parametry strukturalne alfa-II spektryny?

3. W rozdziale czwartym Doktorant postuluje, że ubytek beta-III spektryny w lizatach mózdkowych heterozygotycznych myszy niosących wspomnianą mutację w genie kodującym alfa-II spektrynę wynika z zaburzenia oddziaływań odpowiedzialnych za formowanie heterotetramerów spektrynowych. Jak wytłumaczyć to zjawisko w perspektywie dużej odległości miejsca mutacji od domen uznawanych za odpowiedzialne za heterodimeryzację oraz znacznie większego ubytku beta-III spektryny w porównaniu do stosunkowo niewielkiego obniżenia poziomu alfa-II spektryny?

Od strony formalnej praca wywiera na ogół dobre wrażenie zarówno pod względem stylu wypowiedzi, poprawności gramatycznej i merytorycznej jak i edycji tekstu, ilustracji oraz tabel. Niedociągnięcia mają raczej charakter sporadyczny (np. błędy typograficzne i edytorskie takie jak brak skali na ryc. 7; brak podpisów paneli na ryc. 22 oraz osi Y na ryc. 25; niedokończone zdanie w tytule r. 2.2.4.2; błędy składniowe, jak na przykład w drugim zdaniu r. 2.2.4.3 oraz punkcie 2 na s. 49; użycie niosącej znamiona tautologii formuły „i/lub”, niekonsekwentne stosowanie kursywy dla nazw genów, niekompletny wykaz skrótów, itp.) jednak niektóre z nich, choć stosunkowo nieliczne, mogą u czytelnika wywołać nieco większą konsternację. Przykładowo, brak konsekwencji i spójności w nazewnictwie spektryn (w pracy spotyka się zarówno „a-II spektrynę”, „alfa spektrynę”, „α-II spektrynę” jak i „fodrynę” i „ELF”) oraz w oznaczaniu reszt aminokwasowych (czasem stosowane są skróty jednoliterowe, a czasem trzyliterowe) wywołuje niepotrzebne zamieszanie, podobnie jak niepełne podpisy pod rycinami (np. ryc. 5). Sformułowanie „ekspresja białka” (jak np. ryc. 16) nie do końca jest poprawne (choć spotykane w literaturze anglojęzycznej), gdyż ekspresji ulegają geny. W kilku miejscach (np. s. 31 i 33) można odczuć niedobór odnośników literaturowych. Tego typu błędów jest więcej, ale nie ma potrzeby by je szczegółowo opisywać w recenzji. Niemniej, pragnę podkreślić, że wszelkie drobne niedociągnięcia nie mają większego wpływu na bardzo pozytywny odbiór pracy, która z pewnością stanowi dopracowane i kompletne dzieło naukowe.



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Zalasa spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018r., poz. 1668 z późn. zm.). Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz poświadcza nabycie przez Doktoranta ogólnej wiedzy teoretycznej w reprezentowanej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc pod uwagę moją jednoznacznie pozytywną ocenę wnoszę o dopuszczenie mgr. Michała Zalasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksander Czogalla

dr hab. Aleksander Czogalla, prof. UWr

Kierownik Zakładu Cytobiochemii,
Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, Polska
tel. +48 71 375 63 56, e-mail: aleksander.czogalla@uwr.edu.pl

