



UNIwersYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
W BYDGOSZCZY

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

Katedra Biochemii i Biologii Komórki
ul. Ks. Józefa Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz



Bydgoszcz, dn. 30 lipca 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Zakrzewskiego p.t. **"Udział miozyny VI w procesie spermiogenezy u myszy"** wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Marty Lenartowskiej, prof. UMK jako promotora i dr. Anny Suwińskiej jako promotora pomocniczego.

1. Główne założenia rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Przemysława Zakrzewskiego to zbiór trzech publikacji stanowiących tematyczną całość. Tematyka tych publikacji dotyczy udziału miozyny VI (MYO6) w tworzeniu wyspecjalizowanych struktur komórkowych zaangażowanych w różne etapy dojrzewania spermatyd i uwalniania plemników do kanalików nasiennych. W każdej z tych publikacji stawiane są odrębne cele wypływające z różnych przesłanek, dlatego w autorskim komentarzu Doktorant postawił ogólną hipotezę i sprecyzował szczegółowe cele rozprawy. W oparciu o wcześniejszą wiedzę Doktorant postawił hipotezę, że „MYO6 jest białkiem zaangażowanym w prawidłowy przebieg późnej fazy spermatogenezy u ssaków”. By tę hipotezę zweryfikować Pan Zakrzewski sformułował pięć celów, które pozwoliły mu na zidentyfikowanie izoform MYO6 w jądrach samców myszy, sprawdzenie ich lokalizacji w strukturach komórkowych spermatyd i przylegających do nich podporowych komórek Sertolego, stwierdzenie z jakimi białkami spermatyd oddziałuje MYO6 i które funkcje komórkowe ulegają zaburzeniu na skutek braku aktywnej miozyny VI. Na koniec Doktorant sprawdził, czy u zmutowanych myszy parametry wpływające na zdolność plemników do zapłodnienia są zmienione. Dzięki realizacji tak postawionych celów rozprawa tworzy logiczną całość. Badania opisane w kolejnych publikacjach są konsekwencją wyników uzyskanych w poprzednich.

2. Zastosowane podejście eksperymentalne i otrzymane wyniki

Eksperymentalnym modelem wykorzystanym w badaniach były myszy typu dzikiego oraz homozygotyczne i heterozygotyczne myszy z mutacją w allelu *sv* kodującym niefunkcjonalną MYO6, tzw. myszy *Snell's waltzer*. Badania były przeprowadzone z zachowaniem wszelkich obowiązujących przepisów dotyczących etyki pracy ze zwierzętami. Materiałem badawczym były mikroskopowe skrawki jąder pobranych od mysich samców oraz preparaty pojedynczych spermatyd wraz z przylegającymi do nich fragmentami komórek Sertolego, które wyizolowano z kanalików nasiennych. Materiał ten poddano szerokim analizom biochemicznym i mikroskopowym – RT-PCR, Western Blott, koimmunoprecypitacja, metody cytochemiczne i immunocytochemiczne, które zastosowano w mikroskopii epifluorescencyjnej, konfokalnej i elektronowej. Z oświadczeń współautorów dołączonych do rozprawy oraz informacji zamieszczonych w publikacjach wynika, że Doktorant był wykonawcą wszystkich doświadczeń, które przeprowadził samodzielnie lub z pomocą doświadczonych badaczy. Szeroki zakres stosowanych metod jest godny uznania, a jakość otrzymanych wyników wskazuje na doskonałe opanowanie używanych technik.

W pierwszym etapie badań opublikowanych w *Histochemistry and Cell Biology* (2017, 148: 445-462), Doktorant i jego współpracownicy stwierdzili, że warianty MYO6 obecne w jądrach myszy to izoformy SI i NoI. Świetna jakość uzyskanych obrazów mikroskopowych umożliwiła Doktorantowi zlokalizowanie MYO6 i jej kolokalizację z aktyną w komórkach podczas trzech etapów spermiogenezy. We wczesnej fazie spermiogenezy MYO6 jest obecna w aparacie Golgiego i proakrosomalnych pęcherzykach, a następnie pojawia się w akroplaksomie. W późnej fazie dojrzewania znaleziono ją nie tylko w kompleksie akrosom-akroplaksom ale również w apikalnej specjalizacji powierzchniowej komórek Sertolego. W pracy opublikowanej w *Biology of Reproduction* (102: 868-875, 2020) obecność MYO6 stwierdzono również w kompleksach cewkowo-buławkowatych wytwarzanych na granicy pomiędzy główką spermatydy i komórką Sertolego w VII stadium cyklu spermatogenetycznego. Wysokorozdzielcze techniki mikroskopowe umożliwiły precyzyjne zlokalizowanie MYO6 w różnych rejonach cewek. Wraz ze współpracownikami Pan Zakrzewski wykazał po raz pierwszy, że MYO6 jest obecna w aktyno-zależnych, swoistych dla ssacych jąder strukturach komórkowych.

Analizy tkanek i komórek pobranych od myszy *Snell's waltzer* pozwoliły Doktorantowi określić znaczenie MYO6 dla procesów w które są zaangażowane organelle i struktury komórkowe związane z tą formą miozyny. Badania opublikowane w dwóch numerach *Biology of Reproduction* wykazały, że u zwierząt pozbawionych MYO6 dochodzi do strukturalnych zaburzeń w aparacie Golgiego, nieprawidłowy transport pęcherzykowy,

asymetria akrosomu, zaburzenia struktury i endocytozy w obrębie cewek buławkowatych. Dalsze szczegółowe analizy pozwoliły na stwierdzenie, że spośród znanych białek adaptorowych wiążących MYO6 w procesie spermiogenezy uczestniczy TOM1/L2 i GIPC1. Kolokalizacja MYO6 z białkami adaptorowymi umożliwiła zaproponowanie mechanizmu działania MYO6 i roli tego białka w procesie spermiogenezy. Stwierdzono, że MYO6 uczestniczy w kotwiczeniu i pozycjonowaniu ziarna akrosomalnego oraz w procesie endocytozy połączeń międzykomórkowych w obrębie cewek buławkowatych. W analizach płodności, w których homozygotyczne samce *Snell's waltzer* były krzyżowane z heterozygotycznymi samicami, Doktorant potwierdził obniżoną liczbę potomstwa samców myszy *Snell's waltzer* i połączył ten fakt bezpośrednio z brakiem MYO6. Ponieważ analizy strukturalne i funkcjonalne nie wykazały zauważalnych różnic pomiędzy dojrzałymi plemnikami pobranymi od myszy typu dzikiego i *Snell's waltzer*, to zastanawiam się, czy za zmniejszenie liczby potomstwa nie są też odpowiedzialne defekty innych procesów spowodowane brakiem MYO6 w organizmach homozygotycznych mysich płodów, co mogłoby prowadzić do ich wczesnego obumierania. Proszę Doktoranta o przedyskutowanie takiej możliwości.

Opublikowanie wyników badań w uznanych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania świadczy o tym, że prace te spotkały się z uznaniem międzynarodowego środowiska naukowego. Jako recenzent zbioru prac mogę jedynie potwierdzić, że te wnikliwe badania były konsekwentnie rozwijane i dostarczyły nowych, wcześniej nieznanymi informacji na temat mechanizmów spermiogenezy u ssaków.

3. Struktura pracy

Swoją rozprawę doktorską Pan mgr Przemysław Zakrzewski przedstawił w formie zbioru trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w języku angielskim w czasopismach znajdujących się na liście czasopism punktowanych MNiSW, opatrzonej wprowadzeniem i autorskim komentarzem w języku polskim oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Rozprawa została uzupełniona rozważaniami na temat możliwości rozwoju dalszych badań oraz informacjami o najważniejszych osiągnięciach Doktoranta. Do rozprawy dołączone zostały oświadczenia współautorów publikacji dotyczące ich udziału w powstaniu artykułów. Tak przedstawione osiągnięcia pozwalają na ocenę rozprawy oraz zaangażowania doktoranta w powstanie dzieła stanowiącego podstawę rozprawy.

Format publikacji odpowiada wymogom stawianym przez redakcje pism, zatem całkowicie spełnia wysokie standardy publikacji naukowych. Autorski komentarz został

podzielony na sześć podrozdziałów. We „Wstępie” Autor wprowadza czytelnika w teoretyczne zagadnienia dotyczące struktury i funkcji miozyny VI oraz mechanizmów spermiogenezy. Do tej części autorskiego komentarza została dołączona praca przeglądowa na temat udziału miozyny VI w procesie endocytozy, którą Doktorant we współautorstwie z Prof. Lenartowską opublikowali w *Postęпах Biochemii* w roku 2014, czyli jeszcze przed rozpoczęciem przez niego studiów doktoranckich. Chociaż artykuł jest bardzo interesujący, to wydaje mi się, że wstawienie go do rozprawy zaburza spójność opisu zawartego w autorskim komentarzu. Na przykład budowa MYO6 jest opisana na stronie 5 autorskiego komentarza i na stronie 324 przeglądownki, a termin „koniec minus” użyty na samym początku komentarza znajduje wyjaśnienie dopiero w przeglądownce. Ponadto, szeroki opis mechanizmów endocytozy zawarty w artykule przeglądowym zbytnio odwodzi czytelnika od kwestii bezpośrednio związanych z badaniami prowadzonymi w ramach rozprawy. Rycina 1, którą Doktorant skompilował z rycin zawartych w publikacjach 2 i 3 demonstruje fazy procesu spermiogenezy. W schemacie tym brakuje wyraźnych opisów poszczególnych struktur. Trudno się doszukać w nim akroplaksomu, gdyż w opisie pod ryciną Autor podał, że struktura ta jest zaznaczona kolorem żółtym, a na rycinie żółtym kolorem zaznaczono przede wszystkim cytoplazmę komórki Sertolego i spermatydy. Ani na rycinie ani w tekście Doktorant nie wyjaśnił, w której komórce – spermatydzie, czy komórce Sertolego, jest tworzona apikalna specjalizacja powierzchniowa. Odpowiednią informację znalazłam dopiero w publikacjach.

Kolejna część autorskiego komentarza to „Hipoteza i cele badawcze”, w których Autor w klarowny sposób ujął główną hipotezę i przedstawił cele, z odnośnikami do publikacji, w których zostały one zrealizowane.

W rozdziale „Model badawczy oraz metody eksperymentalne” opisane zostały myszy *Snell's waltzer*, rodzaj pobieranego od nich materiału i metody analizy. Opis metod jest zwarty i klarowny, a szczegóły są zawarte w publikacjach. Lukę stanowi jedynie brak informacji na temat cyklu spermatogenetycznego. Na stronie 11 i 16, jak również w publikacji 3, Autor pisze o VII stadium cyklu. Można się domyślić, że jest to stadium poprzedzające spermiację, ale we „Wstępie” nie doszukałam się opisu całego cyklu.

„Główne tezy rozprawy doktorskiej” to rozdział w którym Doktorant opisał uzyskane wyniki. Za bardzo udany zabieg uważam podzielenie tekstu na paragrafy, których tytuły są jednocześnie głównym wnioskiem wypływającym z opisywanej części badań.

W rozdziale „Perspektywy dalszych badań” Pan Zakrzewski wskazał sieć interakcji MYO6 z białkami, których dotychczas nie analizował. Świadczy to o zdolności Doktoranta

do stawiania hipotez na podstawie różnorodnych przesłanek, co jest podstawową umiejętnością charakteryzującą dobrego naukowca.

Pod względem językowym publikacje są napisane w nienaganny sposób, co z uwagi na znakomitych współautorów, nie jest zaskakujące. Część autorska w języku polskim jest napisana dobrym naukowym językiem, chociaż w kilku miejscach tekst ten można by poddać dodatkowej edycji. Dla przykładu, w drugim akapicie „Wprowadzenia” Autor użył tautologicznego sformułowania „strukturalnej integralności unikalnych struktur”, co brzmi trochę jak struktura struktury. Z kolei, na stronie 10 Doktorant pisze o „potencjalnych partnerach interakcji MYO6”, co nie jest błędem, choć po polsku mówimy raczej o białkach oddziałujących z MYO6 lub partnerach wiążących MYO6. Tego typu pomyłki nie są jednak liczne i nie mają wpływu na mój pozytywny odbiór pracy.

5. Osiągnięcia doktoranta

Szczególną uwagę warto zwrócić na dotychczasową aktywność i osiągnięcia naukowe Doktoranta. Oprócz trzech publikacji, które są podstawą jego rozprawy doktorskiej, Pan Przemysław Zakrzewski jest współautorem dwóch innych prac doświadczalnych opublikowanych w pismach znajdujących się na liście JCR.

Podczas studiów doktoranckich zdobył dwa granty uczelniane dla młodych naukowców, był kierownikiem grantu „Preludium” oraz uzyskał stypendium „Etiuda” przyznawane przez Narodowe Centrum Nauki. Zdobyć aż dwóch grantów w konkursach NCN, jest rzadkim osiągnięciem i zasługuje na szczególne uznanie.

Doktorant odbył dwa kilkumiesięczne staże krajowe w Instytucie Nenckiego w Warszawie oraz trzy staże zagraniczne na Uniwersytecie w Cambridge. Na uwagę zasługuje fakt, że był nie tylko beneficjentem, ale też inicjatorem współpracy z Prof. Folmą Buss.

Pan mgr Zakrzewski był też aktywnym uczestnikiem międzynarodowych konferencji, a na udział w tych wydarzeniach zdobywał środki w formie stypendiów. Jego prezentacje posterowe i referaty były świetnie oceniane i nagradzane. Najbardziej prestiżowe nagrody, które zdobył to nagroda za najlepszą prezentację posterową podczas 44th European Muscle Conference i I nagroda za najlepszą prezentację ustną na 18th FEBS Young Scientist's Forum.

6. Podsumowanie

Przedłożona do oceny rozprawa jest niezmiernie interesującym studium nad udziałem miozyny VI, unikalnego białka motorycznego, w procesach spermiogenezy u myszy.

Doktorant wykazał się umiejętnością rozwiązywania naukowych problemów oraz prowadzenia eksperymentów z użyciem zaawansowanych technik biochemicznych i mikroskopowych. Jako autor korespondujący trzech publikacji udowodnił, że potrafi prowadzić naukową dyskusję i udzielać odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pana mgr. Przemysława Zakrzewskiego spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 i **wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na nowatorski charakter pracy prowadzący do zrozumienia podstawowych procesów życiowych na poziomie molekularnym i komórkowym, międzynarodową współpracę, w której Doktorant aktywnie uczestniczył i jego wiodącą rolę w opublikowanych artykułach, **wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Zakrzewskiego.**

prof. dr hab. Joanna Moraczewska