



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII  
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI  
KIEROWNIK ZAKŁADU  
PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr Przemysława Zakrzewskiego pt. „Udział miozyny VI w procesie spermiogenezy u myszy”

Zdolność do generowania aktywnego ruchu należy niewątpliwie do jednej z najbardziej charakterystycznych cech organizmów żywych. W świecie organizmów żywych aktywny ruch przejawia się na bardzo wielu poziomach organizacyjnych, od poziomu molekularnego zaczynając na ruchu całych organizmów a nawet populacji kończąc. Niezwykle interesujące jest to, że różnorodne typy ruchów opierają się na kilku głównych mechanizmach molekularnych. Jednym z najbardziej znanych mechanizmów generowania ruchu jest oddziaływanie motorów molekularnych z grupy miozyn z filamentami aktynowymi. W tej grupie białek szczególne zainteresowanie wzbudza miozyna VI, która w odróżnieniu od innych poznanych dotąd miozyn porusza się kierunku minus filamentu aktynowego. Co więcej, oprócz roli w generowaniu ruchu, białko to jak wykazuje wiele ostatnich badań jest również zaangażowane w szereg innych procesów biologicznych. Nic dziwnego zatem, że od wielu lat trwają intensywne badania mające na celu określenie roli miozyny VI w funkcjonowaniu komórki.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy roli miozyny VI w procesie spermiogenezy u myszy i jest w pewnym sensie kontynuacją niezwykle interesujących badań prowadzonych przez promotora pracy, Panią dr hab. Martę Lenartowską, prof. UMK. Jej badania dotyczyły udziału miozyny VI w organizacji i dynamice cytoszkieletu aktynowego podczas indywidualizacji spermatyd u *Drosophila melanogaster*. Zatem, oceniana praca doktorska została wykonana w zespole mającym olbrzymie doświadczenie w tego rodzaju badaniach i pod opieką promotora o bardzo dużych osiągnięciach naukowych w tej dziedzinie.

W szczególności, w przedstawionej do recenzji pracy Pan mgr Przemysława Zakrzewski starał się obronić przedstawioną na wstępie hipotezę zakładającą, że biorąc pod uwagę to, że cytoszkielet

UL. GRONOSTAJOWA 7  
30-387 KRAKÓW

TEL. +48 (12) 664 61 42, FAX: +48 (12) 664 62 09

EMAIL: Z.MADEJA@UJ.EDU.PL

W szczególności, w przedstawionej do recenzji pracy Pan mgr Przemysław Zakrzewski starał się obronić przedstawioną na wstępie hipotezę zakładającą, że biorąc pod uwagę to, że cytoszkielet aktynowy odgrywa ważną rolę w spermiogenezie u kręgowców oraz wcześniejsze doniesienia o roli miozyny VI w procesie indywidualizacji spermatyd u *Drosophila melanogaster* możliwe jest, że białko to może być również zaangażowane w przebieg spermiogenezy u myszy.

Od strony formalnej przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi zbiór 3 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełniony obszernym wprowadzeniem i komentarzem autorskim i zakończony streszczeniem w języku polskim i angielskim, listą publikacji wchodzących w skład doktoratu, oświadczeniami współautorów publikacji oraz krótkim opisem perspektyw kontynuacji badań. Możliwość takiego przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Możliwość przygotowania pracy doktorskiej w takiej formie wzbudzała wiele wątpliwości i dyskusji w środowisku naukowym i miała równie wielu zwolenników jak i przeciwników. Najczęściej zgłaszane wątpliwości dla tej formuły dotyczyły trudności w ocenie udziału doktoranta w tworzeniu pracy w przypadku artykułów wieloautorskich oraz możliwości wykorzystywania tych samych publikacji w wielu przewodach. Zdaniem recenzenta, takie wątpliwości w przypadku ocenianej pracy są zupełnie bezzasadne. Gdybym miał przedstawić przykład poprawnie przygotowanej pracy doktorskiej w tej właśnie formule, to bez żadnych wątpliwości mógłbym podać pracę doktorską Pana Przemysława Zakrzewskiego jako wzorcową i nie budzącą żadnych wątpliwości. W szczególności, jest to cykl tematycznie mocno związanych prac, w którym każda kolejna praca jest kontynuacją poprzedniej. Prace te zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych dedykowanych takiej tematyce. Pierwsza w *Histochemistry and Cell Biology* a dwie następne w *Biology of Reproduction*, czasopismach o współczynniku oddziaływania IF odpowiednio 2,2 i 3,3, lub co w przypadku tej tematyki badań może być nawet bardziej miarodajne, punktacji ministerialnej 100 i 200. Prace te już zostały dostrzeżone przez środowisko naukowe i kilkakrotnie cytowane. Po drugie, wiodąca rola Pana Przemysława Zakrzewskiego w powstawaniu tych prac nie budzi żadnych wątpliwości. We wszystkich 3 jest pierwszym autorem, co zwykle w publikacjach z naszej dyscypliny naukowej jest wyznacznikiem wiodącej roli w przeprowadzaniu badań. Co więcej, jest również autorem korespondencyjnym tych prac, co z kolei świadczy niezbicie o jego znaczącym udziale w powstawaniu koncepcji badań oraz napisaniu samych artykułów. Trudno tutaj nie zgodzić się z opinią jednej ze współautorek prac przedstawionej w Jej w oświadczeniu, że w przypadku doktorantów jest to bardzo rzadki przypadek. Po trzecie wreszcie, taki stan rzeczy jaki sobie pozwoliłem zarysować znajduje 100% potwierdzenie w załączonych oświadczeniach współautorów prac. Warto zwrócić

uwagę, że w zasadzie praca doktorska Pana Przemysława Zakrzewskiego mogłaby być cyklem 4 prac albowiem przedstawiona w komentarzu autorskim, a nie wliczona do cyklu, praca przeglądowa o udziale miozyny VI w procesie endocytozy zależnej od klatryny stanowi bardzo dobre uzupełnienie całości tematyki. Praca ta nie mogła jak rozumiem być włączona formalnie do cyklu ze względu na czas publikacji, co notabene stanowi jeszcze jeden przykład negatywnych stron zbytniego sformalizowania procedury nadawania stopnia doktora i sprowadzania jej coraz bardziej do zasad procedury administracyjnej. Reasumując, przedstawiona do recenzji praca pod względem formalnym nie budzi moich najmniejszych wątpliwości.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 40 strony maszynopisu, trzy opublikowane prace doświadczalne oraz tekst jednej pracy przeglądowej, który ze wspomnianych powyżej powodów nie został włączony do cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Po przedstawieniu krótkiego wprowadzenia i zaprezentowaniu wykazu prac stanowiących rozprawę doktorską, Pan Przemysław Zakrzewski w 18 stronicowym Komentarzu Autorskim przedstawia krótki wstęp do przeprowadzonych badań, którego integralną część stanowi wspomniana wcześniej praca przeglądowa dotycząca roli miozyny VI w procesie endocytozy, następnie przedstawia hipotezy badawcze, omawia metody eksperymentalne i stosowany model badawczy aby następnie przejść do podsumowania głównych tez pracy i przedstawić główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań. Ta część Pracy napisana jest przejrzysto i logicznie. Część wstępna prowadzi w jasny sposób do przedstawienia celu pracy. W treści zamieszczonej w tym miejscu pracy przeglądowej (str. 325) zaintrygowało mnie stwierdzenie, że miozyna działająca jako monomer jest białkiem procesywnym. Na czym polega procesywność działania jednogłowego białka motorycznego?

W rozdziale „Model badawczy oraz metody eksperymentalne” autor zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod doświadczalnych oraz wykorzystanego materiału biologicznego. Na podkreślenie zasługuje tutaj zastosowanie przez doktoranta bardzo interesującego modelu badawczego wymagającego oprócz precyzji również dogłębnego zrozumienia badanego przedmiotu, co w dobie powszechnego stosowania różnego rodzaju „kitów” pozwalających na badanie wielu procesów bez ich głębszego zrozumienia zasługuje na podkreślenie. W pracy wykorzystano szereg technik biologii molekularnej, biochemicznych, cytochemicznych oraz metod mikroskopii elektronowej i konfokalnej. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń, a zastosowane w pracy metody doświadczalne są bez wątpienia właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Moje zainteresowanie w opisie metodycznym (Publikacja I) wzbudziła informacja o stosowaniu różnych stężeń BSA do blokowania przy lokalizacji miozyny VI i aktyny (odpowiednio 1% i 3% BSA).

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ



Czy stosowanie takiego zróżnicowania rzeczywiście dawało obserwowalny efekt w jakości preparatów?

Główne obserwacje eksperymentalne przedstawione w pracy doktorskiej zostały jak wspomniano zawarte w 3 pracach doświadczalnych oraz syntetycznie omówione w rozdziale „Główne tezy rozprawy doktorskiej” w komentarzu autorskim. Do najważniejszych wyników przeprowadzonych prac można zaliczyć:

- 1/ Wykazanie, że dwie tzw. krótkie izoformy miozyny VI ulegają ekspresji w jądrach myszy.
- 2/ Stwierdzenie, że miozyna VI znajduje się w strukturach aktynowych biorących udział w procesie spermiogenezy u myszy.
- 3/ Udowodnienie, że brak miozyny VI powoduje zaburzenia budowy struktur zależnych od aktyny biorących udział w akrosomogenezie i spermiacji u myszy.
- 4/ Przedstawienie przesłanek wskazujących, że miozyna VI wraz z białkiem TOM1/L2 odpowiada za utrzymanie symetrii dojrzewającego akrosomu.
- 5/ Wykazanie, że miozyna VI wraz z białkami TOM1/L2 i GIPC1 utrzymuje strukturalną integralność subdomeny endocytarnej kompleksów cewkowo-buławkowatych biorących udział w spermiacji.
- 6/ Wykazanie, że samce myszy pozbawionych miozyny VI wykazują obniżoną płodność.

Podsumowując, otrzymane przez doktoranta wyniki przyczyniają się według mnie do lepszego zrozumienia udziału miozyny VI w procesie spermiogenezy. Szczególnie intrygujące są wyraźne różnice w roli miozyny VI w regulacji tych procesów u myszy i *Drosophila melanogaster*. Byłbym wdzięczny doktorantowi, za syntetyczne porównanie w czasie obrony roli miozyny VI w omawianych procesach w tych różnych organizmach oraz przedstawieniu możliwych powodów takiego stanu rzeczy.

W przedstawionej do oceny pracy Autor wykazał, że brak miozyny VI może powodować występowanie szeregu defektów strukturalnych podczas spermiogenezy u myszy. Wykazał również, że płodność samców pozbawionych miozyny VI jest znacząco (o 26%) obniżona. Co ciekawe, nie stwierdził jednak obniżenia wartości wybranych parametrów plemników. Jedynie liczebność plemników izolowanych z najądrzy samców pozbawionych miozyny VI była obniżona o około 14%. Nasuwa się pytanie, czy takie obniżenie ilości plemników może odpowiadać za 26% spadek płodności? Czy mogą istnieć jakieś mechanizmy odpowiadające za kompensację braku miozyny VI w

plemnikach czy raczej w całej historii ich dojrzewania? Czy Autor brał pod uwagę możliwość sprawdzenia czy plemniki myszy pozbawionych mizozyny VI wykazują obniżoną ruchliwość? Sugerowano również (Michael Eisenbach i współpracownicy), że duże znaczenie w procesie zapłodnienia u ssaków może mieć chemo- i termotaksja plemników. Być może brak mizozyny VI w jakiś sposób jest związany z dysfunkcją tych mechanizmów i to może być przyczyną spadku płodności samców.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Nie budzi to większego zdziwienia ponieważ przedstawione wyniki zostały już opublikowane i od tej strony sprawdzone przez recenzentów i redakcje czasopism. Jednak należy podkreślić, że w pracach przedstawiono wiele poglądowych rysunków ułatwiających wyobrażenie sobie wszystkich dość złożonych relacji przestrzennych w złożonym modelu badawczym, co bardzo ułatwia lekturę pracy. Również dodatkowa część pracy, poza publikacjami, została pod względem edytorskim przygotowana bardzo starannie.

Wszystkie przedstawione tutaj pytania i uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Warto również podkreślić, że oprócz wyników przedstawionych w pracy doktorskiej Pan Przemysław Zakrzewski jest autorem dwóch innych opublikowanych prac naukowych. Sumarycznie wszystkie jego prace (6 artykułów) było już 18 razy cytowanych w literaturze światowej. Warto również wspomnieć, że mimo wczesnego etapu rozwoju kariery naukowej doktorant był już kierownikiem i wykonawcą projektów naukowych, odbył kilka staży badawczych w kraju i za granicą oraz zdobywał liczne stypendia i nagrody różnego rodzaju.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pana mgr Przemysława Zakrzewskiego oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu autor uzyskał wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Zakrzewskiego przez Radę Naukową w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na bardzo wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, wnoszę o rozważenie przez Wysoką Radę możliwości jej wyróżnienia.

  
(Zbigniew Madeja)