

Dr hab. n. med. Monika Oldak, prof. IFPS
Zakład Genetyki
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu
ul. M. Mochnackiego 10
02-042 Warszawa
tel. 22-276-95-85
m.oldak@ifps.org.pl

Warszawa, 29 października 2020r.

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR JUSTYNY JĘDRYCHOWSKIEJ
PT.: „ROLA KANAŁÓW POTASOWYCH BRAMKOWANYCH NAPIĘCIEM
W ROZWOJU UCHA WEWNĘTRZNEGO U DANIO PRĘGOWANEGO”**

wykonanej w Laboratorium Neurodegeneracji
Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
pod kierunkiem prof. dr hab. Jacek Kuźnickiego
oraz dr Vladimira Korzha promotora pomocniczego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Jędrychowskiej dotyczy roli dwóch wybranych alpha podjednostek tworzących kanały potasowe bramkowane napięciem (Kv2.1 i Kv6.4) w rozwoju ucha wewnętrznego. Do swoich badań Doktorantka wybrała organizm modelowy danio pręgowanego, który jest uznanym modelem zwierzęcym stosowanym do badania rozwoju i funkcji ucha wewnętrznego kręgowców. Mając na względzie ważną rolę kanałów potasowych w procesie słyszenia jak również potwierdzoną ekspresję genów (*kcnb1* i *kcg4b*) kodujących oba badane białka w rozwijającym się w błędniku błoniastym danio pręgowanego i obecność transkryptów genu *KCNB1*, będącego ortologiem rybiego *kcnb1*, w narządzie słuchu człowieka, Doktoranta postanowiła sprawdzić czy badane białka są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania ucha wewnętrznego.

Jest to pytanie bardzo ważne, ponieważ rola obu wybranych genów w procesie słyszenia była dotychczas nieznana. Podczas gdy warianty patogenne genu *KCNB1* zostały zidentyfikowane u pacjentów z encefalopatią padaczkową o wczesnym początku (DEE26), status słyszenia tych osób, prawdopodobnie ze względu na ogólny, ciężki przebieg choroby, nie został uwzględniony w dostępnej literaturze. Natomiast gen *KCNG4* nie został na razie powiązany z żadną dziedziczną chorobą człowieka. W swojej pracy Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych, zaawansowanych technik badawczych, obejmujących między innymi zmodyfikowaną metodą CRISPR/Cas9 i mikroskopię fluorescencyjną *light sheet*. Dodatkowo, Doktorantka podjęła wyzwanie uporządkowania nazewnictwa ohnologów danio pręgowanego. W tym kontekście wysoko należy ocenić wybór tematyki pracy doktorskiej Pani Justyny Jędrychowskiej.

Rozprawa doktorska Pani Justyny Jędrychowskiej stanowi część projektu badawczego pt.: „Znalezienie nowych genetycznych uwarunkowań rozwoju układu komorowego mózgu” kierowanego przez dr Valdimira Korzha i finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS11 (nr UMO-2016/21/B/N23/00354). Praca ta ma charakter i układ typowy dla prac doktorskich. Liczy łącznie 143 strony i uwzględniono w niej listę 9 manuskryptów (część z nich w przygotowaniu) i 10 doniesień zjazdowych, których pierwszą autorką lub współautorką jest Pani mgr Justyna Jędrychowska.

Po sporządzeniu *Spisu treści, Spisu rycin i tabel oraz Wykazu skrótów* Doktorantka przedstawia *Streszczenie* pracy w języku polskim i angielskim. Kolejnym elementem pracy jest *Wstęp*, w którym Doktorantka w przystępny sposób opisuje model badawczy danio pręgowanego, zwracając szczególną uwagę na narząd słuchu i równowagi oraz różnice w jego budowie i funkcji między danio pręgowanym i człowiekiem. W drugiej części *Wstępu* omówione zostały kanały potasowe bramkowane napięciem. Doktorantka dokładnie charakteryzuje antagonizm funkcjonalny *Kcnc1* i *Kcnc4b*, ich tkankowe wzory ekspresji oraz rolę *KCNB1* w wewnątrzkomórkowym transporcie białek. Tę część *Wstępu* kończy krótki opis trzech wybranych do dalszej analizy wariantów patogennych *KCNB1* zidentyfikowanych u pacjentów z encefalopatią padaczkową o wczesnym początku. W ostatnim podrozdziale *Wstępu* przybliżony zostaje sposób nazewnictwa ohnologów danio pręgowanego i zawodność aktualnie stosowanego systemu.

Założenia i cele pracy, zarówno cel ogólny, jak i cele pośrednie zostały jasno i logicznie sprecyzowane i wynikają z przesłanek omówionych we *Wstępie*.

Materiały i metody zawierają staranny opis wszystkich stosowanych w pracy technik, w których wykorzystywano embriony i larwy danio pręgowanego, tj. mutageneza metodą CRISPR/Cas9 i genotypowanie, analiza ekspresji genów na poziomie RNA, obrazowanie embrionów danio pręgowanego z użyciem mikroskopii jasnego pola i mikroskopii fluorescencyjnej *light sheet*, analizy morfometryczne, barwienia immunohistochemiczne i fluorescencyjne oraz różne protokoły do hybrydyzacji *in situ* i testy behawioralne. Do bardziej szczegółowej oceny roli genu *KCNB1* w uchu wewnętrznym, Doktorantka posłużyła się narzędziami pozwalającymi na przejściowe wyłączenie funkcji genu (morpholino) i przejściową jego nadekspresję, w ten sposób opracowując test „mózg i ucho wewnętrzne”, pozwalający na stosunkowo łatwe sprawdzanie wpływu ludzkich mutacji w genie *KCNB1* na rozwój embrionów danio pręgowanego. Omawiając zastosowane w pracy metody należy również podkreślić metody wykorzystane przez Doktorantkę do analizy relacji syntenicznych genów, które wskazują na jej biegłość

w wykorzystaniu genetycznych baz danych i umiejętność przygotowania odpowiedniego skryptu do oprogramowania.

Część rozprawy doktorskiej zawierająca *Wyniki* rozpoczyna się od dokładnego przedstawienia fenotypów mutantów dwóch badanych kanałów potasowych bramkowanych napięciem. Ta część pracy zawiera wykresy i tabele dokumentujące, porównane statystycznie, zależności ilościowe oraz zdjęcia obrazujące zidentyfikowane różnice morfologiczne. Na wyróżnienie zasługują zwłaszcza zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego doskonale ilustrujące obserwowane defekty w budowie ucha. Poszukując mechanizmów molekularnych leżących u podstaw obserwowanych zmian morfologicznych, Doktorantka analizuje poziom ekspresji ponad 70 różnych genów wytypowanych na podstawie wcześniejszych analiz transkryptomicznych, znajdując istotne statystycznie różnice dla dużej ich części. Następnie Doktorantka przechodzi do systematycznej analizy wpływu na budowę i funkcję ucha wewnętrznego danio przegowanego trzech wybranych wariantów patogennych zidentyfikowanych w genie *KCNB1* u człowieka, potwierdzając ich chorobotwórczy charakter w różnych układach eksperymentalnych. Wyniki przeprowadzonych analiz bioinformatycznych i zidentyfikowanie przez Doktorantkę dużej liczby przypadków błędnego nazewnictwa genów danio przegowanego, skłoniły ją do zaproponowania kryterium syntenii jako pomocnego elementu do ustanowienia standardowego sposobu nadawania nazewnictwa w oparciu o zależności ewolucyjne.

W *Dyskusji* Doktorantka gruntownie omawia wyniki uzyskanych badań. Ta część pracy podzielona jest na podrozdziały, odnoszące się bezpośrednio do otrzymanych danych. Doktorantka przedstawia je w szerokim kontekście innych badań i ogólnej wiedzy na temat roli kanałów potasowych w budowie i funkcji narządu słuchu i równowagi. Dyskusja została dobrze przygotowana i czyta się ją z przyjemnością. Szerokie podejście do omawianych zagadnień wskazuje, że Doktorantka zdobyła umiejętność krytycznej oceny wyników badań naukowych. Rozprawę doktorską kończy lista trzech precyzyjnych sformułowanych wniosków, odnoszących się właściwie do uzyskanych wyników.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani Justyny Jędrzychowskiej nasuwają mi się dwa spostrzeżenia natury ogólnej. Pierwsze dotyczy analiz morfologicznych narządu równoważno-słuchowego danio przegowanego, które zostały ukierunkowane na ucho wewnętrzne. W wielu badaniach wykorzystujących danio przegowane do modelowania chorób narządu słuchu i równowagi człowieka badane są mechanoreceptory, „neuromasty”, zlokalizowane na powierzchni ciała. Stąd moje pytanie, jakie przesłanki zdecydowały o wyborze do badań ucha wewnętrznego i pominięciu neuromastów? Bardzo jestem ciekawa, czy obserwowane zmiany morfologiczne komórek zmysłowych dotyczą również neuromastów.

Na podkreślenie zasługuje zajęcie się przez Doktorantkę identyfikacją błędów w nazewnictwie genów danio pręgowanego. Poprawne stosowanie terminologii jest niezbędne w języku naukowym. Wprawdzie publikacja naukowa zawierająca ten element pracy doktorskiej została przygotowana do druku, zastanawiam się jednak, czy wynikami analiz relacji syntenicznych przeprowadzonych przez Doktorantkę nie należy szerzej zainteresować środowiska naukowego, przedstawiając je np. na forum europejskiego lub międzynarodowego towarzystwa zebrafish i zainicjować powstanie komitetu zajmującego się nomenklaturą genów ryb doskonałokostnych. A może takie starania zostały już poczynione? Na problemy z nomenklaturą genów człowieka zwrócono uwagę już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, a pierwsze wytyczne powstały prawie dwadzieścia lat później. Aktualnie funkcjonujące HUGO Gene Nomenclature Committee oraz Human Genome Variation Society znacznie usprawniają poruszanie się w bardzo trudnej i dynamicznie rozwijającej się dziedzinie nauki jaką jest genetyka.

Z wyjątkiem drobnych niedociągnięć (błędy interpunkcyjne, literowe, powtórzenia wyrazów) nie stwierdzam żadnych istotnych uchybień w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Jędrychowskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). Doktorantka uzyskała dojrzałość naukową uprawniającą ją do starania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie recenzji pracy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Justyny Jędrychowskiej do dalszego etapu postępowania i publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, wykorzystanie szerokiego zestawu wymagających, nowoczesnych technik badawczych, wieloaspektowość poruszanych zagadnień oraz uwzględnienie w swojej pracy elementów badań translacyjnych, ukierunkowanych na przeniesienie odkryć z poziomu nauk podstawowych do ich potencjalnego zastosowania w naukach klinicznych, zwracam się do Wysokiej Rady również o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Jędrychowskiej.

INSTYTUT
FIZJOLOGII I PATOLOGII SŁUCHU
02-042 Warszawa, ul. Mochnackiego 10
tel. 22 31-18-102, fax: 22 31-18-118
Regon 011692096, NIP 526 17 44 423
-2-

Dr hab. n. med. Monika Otdak
specjalista genetyki klinicznej
1650724