

Warszawa, 30 listopada 2020

Ocena pracy doktorskiej pt.:
**“Rola kanałów potasowych bramkowanych napięciem
w rozwoju ucha wewnętrznego u danio pręgowanego”**
mgr Justyny Jędrychowskiej

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

Temat rozprawy doktorskiej. Przeprowadzone badania miały na celu scharakteryzowanie roli dwóch alfa-podjednostek kanałów potasowych bramkowanych napięciem: KCNB1 i KCNG4 w rozwoju i funkcji ucha wewnętrznego danio pręgowanego. Ze względu na fakt, że u ludzi opisano szereg patogennych mutacji KCNB1, a ich rola w rozwoju ucha nie jest znana, stworzenie modelu zwierzęcego, który w efektywny sposób pozwalałby na testowanie skutków tych mutacji, jest bardzo pożądane. Praca proponuje taki test (nazwany “mózg i ucho wewnętrzne” *in vivo*), wykorzystując danio pręgowanego jako organizm modelowy. Wybór tematu pracy oceniam bardzo wysoko.

Analiza zawartości rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Rozpoczyna się obszernym Wstępem, który dobrze wprowadza założenia pracy, zapoznaje czytelnika z istniejącą literaturą tematu oraz wyjaśnia cel podjętych badań. Starannie wyjaśnia budowę i funkcję ucha wewnętrznego na różnych poziomach organizacji (od budowy anatomicznej po rolę kanałów bramkowanych napięciem i podjednostek KCNB1 i KCNG4). Wstęp zawiera bardzo starannie przygotowane ryciny, które w przejrzysty sposób porównują budowę ucha u człowieka i danio. Opisuje również trzy mutacje w KCNB1 zidentyfikowane u pacjentów, których skutki dla rozwoju ucha są badane w pracy doktorskiej. Wstęp wprowadza również do zagadnienia nazewnictwa ohnologów danio pręgowanego podjętego w ostatniej części pracy. Materiały i metody szczegółowo opisują techniki wykorzystane w pracy – metody hodowli, mutagenezy, genotypowania i obrazowania danio pręgowanego, a także testy oceniające zmysł równowagi. Rozdział Wyniki zawiera staranny i szczegółowy opis rezultatów pracy. Przeprowadzone doświadczenia wykazały zmieniony fenotyp mutantu KCNB1 – zmniejszone uszy i otolity, nieprawidłową morfologię komórek rzęsatych, zaburzenia zmysłu równowagi i zaburzenia ekspresji szeregu genów, których ekspresja jest istotna dla rozwoju błędnika. Ponadto wykazano, wykorzystując zmodyfikowaną technikę CRISPR/Cas9 do stworzenia dwóch nowych mutantów, że mutacje KCNG4 prowadzą do zmian morfologicznych w budowie ucha wewnętrznego, a fenotyp rozwijających się embrionów zależy od charakteru wprowadzonej mutacji. Testy efektów przejściowej nadekspresji wariantów patogennych ludzkiego KCNB1 w embrionach danio pręgowanego, u których wyciszono



funkcjonowanie endogennego KCNB1, wykazały, że wywierają one różne efekty na morfologię rozwijającego się ucha wewnętrznego, układu komorowego i komórek rzęsatych. Ten element pracy zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ może służyć jako system do przesiewowego badania skutków określonych mutacji *in vivo*. Ostatnia część pracy skupia się na analizie nazewnictwa ohnologów danio pręgowanego. Przeprowadzona analiza pozwoliła na znalezienie licznych nieprawidłowości w stosowanej nomenklaturze i zaproponowanie innego od powszechnie stosowanego podejścia, polegającego na traktowaniu niszcuki plamistej, wczesnego przodka doskonałokostnych, jako punktu odniesienia dla ustalania nazewnictwa. Konwencja taka ma uzasadnienie ewolucyjne i wydaje się być dobrym pomysłem na uporządkowanie i wystandaryzowanie nazewnictwa ohnologów. Uzyskane wyniki przedstawione są na dobrze przygotowanych rycinach – są one czytelne, odpowiednio ilustrują opisywane dane, są zaopatrzone w schematy ułatwiające zrozumienie szczegółów (co jest szczególnie ważne przy rycinach prezentujących zmiany w budowie ucha powodowane przez badane mutacje). Na szczególne docenienie zasługuje fakt weryfikowania uzyskanych wyników za pomocą różnych technik doświadczalnych, co zdecydowanie je uwiarygadnia. Pracę kończy Dyskusja wyników, w której otrzymane wyniki są analizowane w kontekście istniejącej literatury przedmiotu. W szczególności dyskutowana jest rola KCNB1 i KCNG4 w rozwoju ucha wewnętrznego danio pręgowanego, wpływ wprowadzenia trzech ludzkich mutacji w KCNB1 na rozwój ucha wewnętrznego i problemy z nazewnictwem ohnologów danio pręgowanego. Przedstawione w dyskusji rozważania są logiczne i prowadzą do wniosków końcowych.

Uwagi krytyczne. Po lekturze pracy mam kilka - drobnych - uwag krytycznych:

1. Nie jest dyskutowane dlaczego niektóre zmutowane osobniki nie przejawiały zaburzeń zmysłu równowagi (odpowiedź na dotknięcie igłą – ok. 20% mutantów, odpowiedź na wibracje ok. 30%).
2. Na str. 74 znajdujemy stwierdzenie “Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że brak prawidłowej funkcji *Kncb1* powodował zaburzenia zmysłu równowagi. W konsekwencji, larwy wykazywały dezorientację w postrzeganiu przestrzeni, co przekładało się bezpośrednio na ich zdolność do prawidłowego pływania i w związku z tym, *mogło redukować umiejętność polowania i zdobywania pokarmu. W ten sposób można tłumaczyć zwiększoną śmiertelność osobników linii *kcnb1*^{-/-}, zaprezentowaną we wcześniejszej części tego rozdziału.*”. Nie zostało wyjaśnione, czy w warunkach hodowlanych larwy muszą polować, żeby zdobyć pokarm.
3. Brak w dyskusji odniesienia do efektów funkcjonalnych mutacji.
4. W opisie analizy statystycznej brakuje informacji o metodach badania, czy założenia testu (w tym wypadku testu t-Studenta), takie jak normalność rozkładu, zostały spełnione.
5. Ryciny prezentujące hybrydyzację *in situ* są mało czytelne
6. Ryc. 4.4 nie podaje, co prezentowane jest na panelach B i D; Tabela 4.2 typ stwierdza, że typ dziki przejawiał 0% normalnych odpowiedzi, co wydaje się błędem.
7. W pracy pojawiają się – bardzo nieliczne – błędy edycyjne i niezręczności językowe (np. Problemy z zachowaniami behawioralnymi, str. 38), generalnie jednak praca jest przygotowana bardzo starannie, zaopatrzona w czytelne ryciny i tabele dobrze ilustrujące prezentowane tezy.



Podsumowanie. Przedstawione powyżej drobne uwagi krytyczne nie wpływają na moją ogólną bardzo pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Przedstawiona rozprawa wskazuje na dojrzałość naukową kandydatki, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, odzwierciedla wszechstronną wiedzę kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym 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. z 2014 r. poz.1852 oraz z 2015 r. poz 249 i 1767), będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora biologii. Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie pani mgr Justyny Jędrychowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej rozprawy naukowej z uwagi na szczególną wartość naukową przedstawionych w niej wyników.

dr hab. Ewelina Knapska