



Warszawa, 18 września 2013.

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Małgorzaty Kwaśniak

Pt.: „Dialog mitochondrialno-jądrowy w odpowiedzi na zaburzenie translacji mitochondrialnej u *Arabidopsis*”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani magister Małgorzaty Kwaśniak, wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Hanny Jańskiej, w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego, jest bardzo obszernym opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 142 stronach maszynopisu, z 32-ma rycinami oraz 27-ma tabelami. Treść ocenianej pracy doktorskiej obejmuje istotne i wymagane części tj. teoretyczny Wstęp, opisy: Materiałów, Metod i Wyników oraz Dyskusję, a także Spis Literatury i Suplement zawierający 5 załączników, w tym życiorys naukowy doktorantki.

Mitochondrium to autonomiczne organellum komórkowe niezbędne dla funkcjonowania komórek eukariotycznych. Tylko niewielka część tzw. białek mitochondrialnych jest kodowana, transkrybowana czy podlega translacji na terenie tego organellum. Zadziwiającym jest fakt, że choć od lat dysponujemy informacjami o genomach, transkryptomach czy proteomach mitochondrialnych to zagadnienie regulacji syntezy czy degradacji mitochondrialnych białek jest nadal słabo poznane. Niewiele wiadomo na temat problemu utrzymywania balansu (tzw. stechiometryczności) komponentów kodowanych i syntetyzowanych w różnych przedziałach komórkowych (jądro *versus* mitochondrium). Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy właśnie tego problemu. Dla realizacji bardzo ambitnego zadania doktorantka stworzyła bogaty zestaw „narzędzi”, umożliwiających precyzyjne badanie regulacji:

- ploidalności DNA, tak w jądrach jak i w mitochondriach,
- ekspresji genów kodowanych w obu organellach,
- translacji mitochondrialnej na matrycach mRNA pochodzącego z jądra lub mitochondrium,
- proteolizy białek w mitochondriach.

Zastosowane w pracy doktorskiej podejścia doświadczalne są nie tylko zasadne ale przede wszystkim niezwykle użyteczne i „twórcze”. Właśnie ten fakt przyczynił się do opublikowania znaczącej części wyników, wchodzących w skład dysertacji, w najbardziej prestiżowym czasopiśmie z dziedziny biologii molekularnej i komórkowej roślin - *The Plant Cell* (IF = 10,125; średni z 5-ciu ostanich lat),

gdzie mgr M. Kwaśniak jest pierwszym autorem. Dodatkowo artykuł ten został wyróżniony komentarzem redakcyjnym, przez Nancy R. Hofmann, w majowym numerze TPC 2013.

Niezwykle wysoko oceniam rangę i znaczenie badań podjętych kilka lat temu przez Prof. Hannę Jańską i Jej współpracowników, których celem było uzupełnienie wiedzy dotyczącej procesów regulacji transkrypcji i translacji oraz dystrybucji białek mitochondrialnych, ze szczególnym uwzględnieniem odpowiedzi roślin na zmiany środowiskowe.

Część doświadczalną rozprawy poprzedza kompetentnie napisany Wstęp literaturowy, w którym doktorantka omówiła molekularne aspekty działania mitochondriów. Dużo uwagi autorka poświęciła charakterystyce genomu mitochondrialnego oraz zmianom ekspresji informacji genetycznej na wszystkich poziomach regulacji. W kolejnej części Wstępu autorka przedstawiła mechanizmy, umożliwiające komunikację pomiędzy mitochondriami i jądrem. W końcowej części Wstępu autorka omówiła kilka z proponowanych obecnie modeli przedstawiających specyficzną, mitochondrialną syntezę białek.

Należy podkreślić, że Wstęp zawiera zasób informacji całkowicie wystarczający do dalszego śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągania wniosków. Uwagę zwraca znajomość specjalistycznej literatury z tematyki związanej z pracą (większość cytowanych danych opublikowano w ciągu ostatnich lat) i przedstawienie najnowszych hipotez próbujących tłumaczyć zagadnienia będące przedmiotem rozprawy.

Rozdział Materiały i Metody zawiera wszystkie informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia przedstawionych w pracy doświadczeń. Lista opisanych technik, które były stosowane w pracy jest bardzo długa i wraz z przedstawionymi wynikami nie pozostawia wątpliwości, że doktorantka opanowała metodykę badań w dziedzinie nowoczesnej biochemii i biologii molekularnej roślin.

Część pracy opisującą uzyskane Wyniki doświadczalne można podzielić na dwie zasadnicze części:

1. Charakterystyka hemizygotycznej linii *Arabidopsis thaliana* upośledzonej w ekspresji jądrowego genu *RPS10*.
2. Charakterystyka homozygotycznej pod względem *quasi* mutacji *rps10* linii *A. thaliana*.

Punktem wyjścia dla prowadzenia przez doktorantkę dalszych badań było wykorzystanie, wcześniej wyprowadzonych w Pracowni Prof. Hanny Jańskiej, transgenicznych linii *A. thaliana* ze znacznie obniżoną ekspresją genu *RPS10* (dla ułatwienia linie nazywano mutantami *rps10*). Doktorantka przeprowadziła wieloetapową analizę, z wykorzystaniem różnych technik nowoczesnej biologii molekularnej, biochemii - w tym syntezy białek *in organello*, mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej, w celu poznania zasad regulujących syntezę i proteolizę białek działających w obrębie mitochondrium, a kodowanych zarówno w genomie jądrowym, jak i mitochondrialnym. Analizy te dostarczyły niezmiernie interesujących danych dotyczących zwłaszcza białek, czy kompleksów wielopodjednostkowych, kodowanych w różnych przedziałach komórkowych. Wykazały między innymi, że obniżony poziom białka RPS10 silnie zaburza biogenezę mitorybosomów. W kolejnych etapach, stosując przygotowany przez siebie warsztat, doktorantka wykazała, że dla zachowania zrównoważonego poziomu białek kodowanych mitochondrialnie, w stosunku do białek kodowanych jądrowo, konieczne jest włączenie mechanizmów kompensacyjnych. Mechanizmy te to: amplifikacja

genomu mitochondrialnego, zwiększenie wydajności translacji specyficznego mitochondrialnego mRNA, wzrost poziomu ekspresji genów jądrowych kodujących zależne od ATP proteazy działające na terenie mitochondriów, czy genów tworzących tzw. *mitochondrial dysfunction regulon*. Co niezmiernie ciekawe, kompensacji tej komórka roślinna nie uzyskuje poprzez zwiększenie liczby mitochondriów. Pomimo że, przedstawione w dysertacji wyniki dokumentują dopiero pierwszy etap prowadzonych w tym zakresie badań, uzyskane wyniki są bardzo ciekawe i zachęcają do prowadzenia dalszych analiz, w tym zastosowanie technik wysokoskalowych (ang. *high-throughput*).

Analizując część dysertacji opisującą uzyskane wyniki, nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości, na które nie znalazłem odpowiedzi w treści rozdziałów Wyniki i Dyskusja. W związku tym proszę o ustosunkowanie się do nich i omówienie podczas publicznej obrony:

- Jak uzyskano i jak sprawdzono homozygotyczność linii z wyciszonym genem *rsp10*?
- Dlaczego w przypadku linii hemizygotycznych zdecydowano się na prowadzenie badań w warunkach krótkiego dnia (8 godz.)? Są one uważane za suboptymalne jedynie dla utrzymywania roślin w wegetatywnej fazie rozwoju.
- Co zdaniem doktorantki może być powodem zmian w fenotypie (kształt liści), w piątym tygodniu uprawy mutantu hemizygotycznego *rps10*, linia P2?
- Czy można porównywać wyniki, uzyskane przez doktorantkę dla linii homozygotycznej, hodowanej w warunkach płynnych i na podłożu stałym? Ciśnienie parcjalne tlenu w obu warunkach jest różne, a uprawa w warunkach płynnych ma znamiona hipoksji, co dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów jest niezwykle ważne.

Generalnie cała rozprawa napisana jest bardzo jasno i klarownie. Ryciny i ich podpisy są tak skomponowane, że ich interpretacja jest łatwa i w pełni jednoznaczna. Język używany w rozprawie, umożliwia zrozumienie tekstu czytelnikowi niekoniecznie związanemu bezpośrednio z przedmiotem dysertacji. Widać, że autorka starała się unikać wyrażen i skrótów z tzw. gwary laboratoryjnej. **Jedynie z powinności recenzenta** przytaczam nieliczne z zauważonych błędów edytorskich i lapsusów językowych:

- Brak jest spisu rycin i używanych skrótów. Jest to element, który nie tylko zwyczajowo włącza się do dysertacji, ale ułatwia on czytelnikowi analizę tekstu.
- W wielu rycinach, sentencja „...Poziom transkryptów jest wyrażony w postaci skali logarytmicznej (\log_2), gdzie jako wartość 0 przyjęto średnie wartości transkryptu obserwowane w przypadku roślin typu dzikiego...” jest niezgodna z obrazem wykresów, gdzie zastosowana skala jest ciągła a nie logarytmiczna. Jedynie wartość liczbowa wyrażająca poziom ekspresji jest logarytmem przy podstawie 2.
- Str. 81 linia 16; autorka pisze „...Otrzymane rezultaty zaskoczyły nas i na obecnym etapie badań są trudne do interpretacji...”. Wszystko byłoby dobrze gdyby stwierdzenie to padło po opisie uzyskanych wyników, a nie jak to ma miejsce w rozprawie, przed ich opisem!
- Nie bardzo rozumiem dlaczego konsekwentnie, w całej rozprawie, w przypadku wartości pH liczby określające dziesiętne części oddzielone są kropką a nie przecinkiem. W obowiązującym

w Polsce standardzie pisania liczb, całości od części dziesiętnych oddziela się przecinkiem, a nie kropką czy reguła ta nie obowiązuje w przypadku określania wartości pH?

W swej końcowej ocenie pracy, chciałbym podkreślić umiejętne przedstawienie przez doktorantkę celowości prowadzenia kolejnych doświadczeń. Prezentowane, zarówno w Wynikach jak i Dyskusji, analizy uzyskanych wyników dają podstawy do stwierdzenia, że autorka potrafi nie tylko właściwie zaplanować doświadczenie, ale przede wszystkim prawidłowo zinterpretować jego wyniki. Jest także w stanie krytycznie je zanalizować, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych autorów oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm danego zjawiska, który byłby zgodny z dostępnymi danymi literaturowymi. Co więcej, wyniki uzyskane przez doktorantkę otwierają „zupełnie nową przestrzeń badawczą” w dziedzinie badania mechanizmów regulujących syntezę i lizę białek w organellach, takich jak mitochondria, chloroplasty czy plastydy.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa to praca świadcząca o nabyciu przez doktorantkę przygotowania warsztatowego w trudnej dziedzinie, której się poświęciła, spełniająca ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Mając na uwadze ogrom wykonanej pracy a także fakt, że część wyników została opublikowana w najbardziej prestiżowych pismach z zakresu biologii molekularnej roślin, sugeruję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Stawiam wniosek, do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Kwaśniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jacek Hennig