



dr. hab. Joanna Szczepanowska prof. nadzw.
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, 12 czerwca 2014

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Elwiry Smakowskiej

pt. „Analiza funkcjonalna mitochondrialnej proteazy AtFtsH4 ze szczególnym uwzględnieniem badań proteomicznych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Jańskiej z Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

Mimo, że od odkrycia mitochondriów minęło już ponad 100 lat to ciągle jeszcze nie znamy właściwości i funkcji bardzo wielu białek mitochondrialnych. Mitochondria są wielofunkcyjnymi organellami, decydującymi o życiu lub śmierci komórki. Defekty funkcjonowania mitochondriów mogą być nawet pierwotną i wczesną przyczyną wielu chorób. Zatem w komórce w odpowiedzi na zmianę funkcjonowania mitochondriów uruchamiane są różne ścieżki sygnałowe i w konsekwencji następuje rekonfiguracja metabolizmu komórki. Właśnie proteazy mitochondrialne są szczególnie zaangażowane w prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów poprzez kontrolę zarówno jakościową jak i ilościową białek mitochondrialnych. Doktorant w przedstawionej mi do recenzji rozprawie scharakteryzował pod względem funkcjonalnym jedną z wielu proteaz mitochondrialnych zależnych od ATP z rodziny AAA+, proteazę AtFtsH4 z *Arabidopsis thaliana*. Problematyka rozprawy mgr Elwiry Smakowskiej doskonale wpisuje się w nurt badań nad zrozumieniem funkcjonowania mitochondriów i wnosi bardzo ważne, nowe obserwacje dotyczące właściwości działania białka - proteazy AtFtsH4.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest zawarta na 255 stronach i ma w zasadzie typowy układ dla tego rodzaju opracowań. Rozpoczyna się spisem treści, streszczeniem po polsku i angielsku, wstęp liczy 47 stron i zawiera 11 rycin i 3 tabele. Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy znajduje się liczący 39 strony rozdział „Materiały i Metody” zawierający jedną rycinę i 4 tabele. Wyniki



liczą 77 stron i zawierają 37 rycin i 5 tabeli; po nich następuje 10 stronicowa dyskusja i wnioski końcowe obejmujące 3 strony. Następny obfity rozdział to „Załączniki”, w którym umieszczono szczegółowy opis licznych metod biologii molekularnej takich jak np. klonowania, otrzymywania roślin transgenicznych, starterów oraz rezultatów identyfikacji białek metodą spektrometrii mas. Rozprawa kończy się 2 stronicowym spisem skrótów oraz 19 stronicowym piśmiennictwem, na które składa się 254 pozycji literatury, w tym znaczna ich część to prace z ostatnich kilku lat.

Ocena merytoryczna

To, że większość zacytowanych prac w rozprawie pochodzi z lat 2000-2014, świadczy o tym, że badania dotyczące funkcjonowania proteaz mitochondrialnych są bardzo nowym i niezbadanym polem w dziedzinie nauki zwanej „mitochondriologią”.

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o dziedzinie, której poświęcona jest rozprawa, a więc poznanych dotychczas białkach proteolitycznych mitochondriów ze szczególnym zwróceniem uwagi na proteolityczny system roślinny, na cały proteom mitochondrialny roślin oraz stres oksydacyjny. Nie mam w zasadzie uwag do tej części rozprawy, jest napisana w sposób czytelny i zrozumiały, jedynie może zbyt szczegółowy. Może zwrócić uwagę tylko, że tlenek azotu w komórce nie tylko jest syntetyzowany przez mitochondrialną syntazę tlenku azotu ale głównie przez inne komórkowe syntazy tlenku azotu.

Cel pracy to analiza funkcjonalna proteazy roślinnej AtFtsH4, identyfikacja potencjalnych substratów i partnerów tego białka oraz określenie profilu poziomu białka przy pomocy badania aktywności promotora, transkrypty w warunkach wzrostu. Cel ten Doktorant realizował na poziomie zarówno molekularnym jak i całego organizmu jakim jest *Arabidopsis thaliana* L. Przyznaję, że realizacja tego zadania była bardzo ambitnym wyzwaniem.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych opisanych w rozdziale **materiał i metody**. Zawiera on spis użytych w toku badań odczynników, starterów i konstruktyw/plazmidów (głównie opisanych szczegółowo z rozdziale załączniki) oraz opis zastosowanych w toku pracy metod w tym: prowadzenia hodowli roślin, procedur izolacji mitochondriów



itd. Z uwagi na bardzo różnorodny warsztat badawczy nie sposób w tym miejscu wymienić użytych wszystkich technik. Opis metod jest moim zdaniem wyczerpujący i klarowny, co nie było łatwe do osiągnięcia. Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych potknięć. Nigdzie w wynikach (w rozdziale wyniki) nie znalazłam użycia opisanej metoda barwienia białek w żelu poliakrylamidowym – srebrem. Ponadto chciałabym wiedzieć czy identyfikacja białek metodą spektrometrii mas MALDI-TOF była wykonana przez doktorantkę czy przez specjalistów. Wiem, że jest to bardzo wyrafinowana technika i stąd moje pytanie, bo odpowiedzi na nie, nie mogę znaleźć w rozprawie doktorskiej.

W rozdziale **wyniki** Doktorant przejrzysto opisuje uzyskane przez siebie dane, a jest ich niemało. W zasadzie to można by nimi obdzielić co najmniej dwie rozprawy doktorskie. Imponujący jest również jego warsztat badawczy, sposób przedstawienia wyników oraz to, że wykonano możliwe do wykonania kontrole. Pracę rozpoczęła Doktorantka od opisanego fenotypu mutantów – tzn. roślin pozbawionych funkcjonalnej proteazy, w różnych warunkach hodowli. Brakuje mi jedynie przy Ryc. 4.4 i 4.6 pokazania fotografii reprezentatywnego żelu z poziomem białka. Natomiast, na stronach 163, 165 i 166 powtarzają się fotografie tego samego żelu (a właściwie obrazu po transferze). Dalej następuje opis badań aktywności promotora proteazy i bardzo szeroki dział porównujący proteom mitochondrialny mutantów *fish4* z dzikim typem. I podobnie przy Ryc. 4.21 brakuje mi fotografii przykładowego żelu. Oprócz tego muszę w tym miejscu napisać (bo czasami pojawia się w pracy ta pomyłka), że białka ATP1 jak i ATP2 oraz sama syntaza ATP nie zalicza się do kompleksów łańcucha transportu elektronów (tylko kompleks I – IV). Dalej to porównanie wrażliwości wyizolowanych mitochondriów z mutantu i dzikiego typu. I tutaj mam wątpliwości co do zastosowanej metody tzn. inkubacji wyizolowanych mitochondriów w 1 mM H₂O₂. Takie warunki wydają się być zbyt drastyczne nie tylko dla całej komórki, a co dopiero dla wyizolowanych mitochondriów. Bardzo proszę aby Doktorantka ustosunkowała się do wyboru tego typu stresu.

Oczywiście świetnym pomysłem było otrzymanie rewertantów roślin oraz mutantów roślin z aktywną domeną proteolityczną bądź aktywną domeną białka opiekuńczego. Te doświadczenia posłużyły dalej w poszukiwaniach substratów proteazy AtFtsH4. Autor wyselekcjonował spośród wielu poddanych analizie białek, że najbardziej prawdopodobnymi substratami tej proteazy jest białko AtFtsH10 oraz prohibityna



Dyskusja jest napisana bardzo dobrze i wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta. Umiejętnie dyskutuje on swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe.

Umieszczone na końcu bardzo szczegółowe wnioski, podsumowują klarownie co zostało zbadane. Przy tak licznych wynikach opisanych w rozprawie na pewno jest to bardzo pomocne dla czytelnika, szczególnie przy ocenie rozprawy.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest zredagowana w miarę staranny sposób, napisana w zasadzie poprawnym językiem. Doktorant jednak nie ustrzegł się szeregu drobnych błędów gramatycznych i stylistycznych czy literówek, które jednak nie wpłynęły na zrozumienie tekstu. Jedynie obowiązek recenzenta skłania mnie do zwrócenia uwagi na niewielkie uchybienia edytorsko-językowo-terminologiczne. Te najważniejsze omówione zostaną z Doktorantem osobiście. Pragnę jeszcze zaznaczyć, że w rozprawie doktorskiej powinno się używać terminów polskich i np. zamiast „matriks” powinno być „macierz”, „kompartenty” powinno być „przedziały” itd. Jeszcze jedna uwaga dotyczy zbyt skąpej listy używanych skrótów. W rozprawie bardzo często, raz był używany skrót a raz pełna nazwa, co też trochę czyni bałagan przy czytaniu tekstu.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Elwiry Smakowskiej ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę na temat funkcji jednej z mitochondrialnych proteazy. Praca jest spójna tematycznie z wyraźnie postawionym celem i kolejno weryfikowanymi hipotezami. Poszczególne rozdziały są zwarte a główny cel badawczy znajduje w każdym z nich właściwe miejsce. Trudny i wyjątkowo obszerny i niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o dobrym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej, o umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także o znajomości rozległego piśmiennictwa w badanej dziedzinie i zdolności dyskusji własnych wyników badawczych w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań, zaś wyciągnięte wnioski są uzasadnione. Przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze, nie umniejszają bardzo wysokiej oceny rozprawy.



instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Elwiry Smakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez Nią stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej, wnioskuję o jej wyróżnienie stosownie dla Rady Wydziału nagrodą.

dr hab. Joanna Szczepanowska prof. nadzw