



Prof. Dr hab. Grzegorz Jackowski

Uniwersytet im. A. Mickiewicza

1 Instytut Biologii Eksperymentalnej

Ul. Umultowska 89

61-614 Poznań

Poznań, 27 stycznia 2017r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR RENATY SKIBIOR-BŁASZCZYK

„Poszukiwanie proteaz istotnych dla funkcjonalności i morfologii roślinnych mitochondriów”

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich dekadach wskazują jednoznacznie, że regulacyjna hydroliza białek jest procesem w bardzo istotny sposób wpływającym na strukturę i funkcje organizmu roślinnego w zmieniających się warunkach środowiskowych i zmiennym kontekście ontogenetycznym, stanowi bowiem element obrotu metabolicznego białek, systemu kontroli jakości białek oraz odgrywa istotną rolę w przebiegu szlaków sygnalizacyjnych - uruchamianych w odpowiedzi na działanie rozmaitych bodźców egzo- i endogennych - regulujących wiele ważnych procesów komórkowych (m. in. ekspresję genów, cykl komórkowy, różnicowanie, kierowanie i sortowanie białek, przebieg programowanej śmierci komórkowej).

Proteazowa baza *MEROPS* (wersja 11.0) wymienia dla *Arabidopsis thaliana* – modelowej rośliny kwiatowej – aż 959 białek jako potwierdzone lub prawdopodobne enzymy proteolityczne, co stanowi ponad 3% proteomu tego gatunku. Jednym z systemów enzymatycznej hydrolizy białek roślinnych, obok UPS oraz różnych wariantów autofagii są proteazy funkcjonujące w chloroplastach, mitochondriach, peroksosomach i świetle retikulum endoplazmatycznego. Stan wiedzy w zakresie funkcji jakie na poziomie komórki i całego organizmu roślinnego mają do spełnienia enzymy proteolityczne zlokalizowane we wspomnianych organellach bardzo się rozszerzył w ostatnich latach a jedną z najbardziej eksponowanych pozycji na mapie ośrodków które rozwijają nurt badawczy odnoszący się do funkcji proteaz mitochondrialnych zajmuje zespół Zakładu Biologii Molekularnej Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego, kierowany przez Panią Profesor Hannę Jańską. Właśnie w ten nurt badawczy wpisuje się rozprawa doktorska p. mgr Renaty Skibior-Błaszczak.

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań

NIP 777 00 06 350, REGON 000001293

Doktorantka zdefiniowała dwa równorzędne cele strategiczne swoich badań, a mianowicie

- identyfikacja *in silico* genów kodujących dotąd nie przebadane proteazy *A. thaliana* ortologiczne względem proteaz drożdżowych działających w sposób niezależny od ATP, ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji proteaz kodowanych przez te geny i poddanie tych spośród proteaz które okażą się być zlokalizowane w mitochondriach badaniom zmierzającym do określenia roli tych enzymów w kontroli wybranych cech fenotypowych, w tym przebiegu ontogenezy i aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego
- ustalenie roli dwóch wybranych proteaz mitochondrialnych *A. thaliana* w regulacji lipidomu mitochondrialnego oraz morfologii mitochondriów – wybrane proteazy to AtATP23 (niezależna od ATP, zidentyfikowana w ramach wykonywania celów cząstkowych związanych z pierwszym celem strategicznym badań) oraz AtFtsH4 (zależna od ATP, już wcześniej intensywnie badana w zespole prof. Jańskiej, ale w odniesieniu do regulacji innych funkcji)

Opiniowana rozprawa obejmuje 186 stron druku, w tym 21-stronicowy zestaw trzech załączników w których umieszczono szczegółowe dane dotyczące używanych w pracy konstruktów genetycznych, roślin transgenicznych i starterów wykorzystywanych w reakcjach PCR. Wraz ze wspomnianymi załącznikami rozprawa zawiera 80 ilustracji i 11 tabel. Pięć innych załączników zawierających część wyników analiz lipidomicznych zapisano na dysku kompaktowym. Do rozprawy dołączono ponadto kopie dwóch oryginalnych prac badawczych powstałych ze współudziałem doktorantki.

Zawartość rozprawy jest typowa dla rozpraw doktorskich z zakresu biologii eksperymentalnej a mianowicie składa się na nią streszczenie (w dwóch wersjach językowych) wstęp, opis części metodycznej, opis celu badań, wyniki, wnioski, dyskusję i spis piśmiennictwa.

W rozdziale „Wstęp”, liczącym 33 strony zreferowano aktualny stan wiedzy odnoszącej się do podstawowej aktywności funkcjonalnej mitochondriów, tj. systemu fosforylacji oksydacyjnej (łańcuch oddechowy + synteza ATP) w powiązaniu z danymi na temat organizacji strukturalnej zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej

wielokładnikowych kompleksów i superkompleksów współkatalizujących łańcuch oddechowy oraz syntezę ATP. W dalszej części „Wstępu” przedstawiono współczesne poglądy na temat procesów fuzji i podziału mitochondriów a ostatnią – najobszerniejszą - częścią „Wstępu” jest przegląd stanu wiedzy na temat funkcji ATP-zależnych i ATP-niezależnych enzymów proteolitycznych działających wewnątrz mitochondriów drożdży, człowieka i *A. thaliana*. Na tym tle doktorantka formułuje wspomniane już dwa cele strategiczne swoich badań oraz cele cząstkowe służące wykonaniu celi strategicznych. Oceniam rozdział „Wstęp” jako dobrze wprowadzający czytelnika w materię której dotyczą dalsze rozdziały rozprawy. Został napisany kompetentnie i wnikliwie a poszczególne jego fragmenty ewidentnie zdradzają szeroki kontakt autorki z aktualnym piśmiennictwem światowym. Niewielkie zastrzeżenia można mieć do języka do którego w niektórych fragmentach „Wstępu” wkrały się wyrażenia żargonowe, jak np. „podjednostki kodowane mitochondrialnie” (np. str. 14) zamiast “podjednostki kodowane przez geny genomu mitochondrialnego” czy wyrażenia niepoprawne w rodzaju określenia „mitochondrialnie kodowane geny” (str. 20) zamiast „geny genomu mitochondrialnego”. Jedyny poważniejszy błąd merytoryczny jaki się wkrał do tekstu „Wstępu” polega na przypisaniu proteazom FtsH przynależności do rodziny termolizyn M41 (str. 28) podczas gdy w istocie należą one do rodziny FtsH (numer rzeczywiście M41), dla której holotypem jest proteaza FtsH z *E. coli* (termolizyny zaś należą do rodziny M4 dla której holotypem jest termolizyna z *Bacillus thermoproteolyticus*).

Rozdział „Materiały i metody” wywiera na mnie bardzo dobre wrażenie przekonuje bowiem, że zastosowano bardzo nowoczesne i różnorodne podejścia metodyczne. Doktorantka porusza się swobodnie wśród wielu, nawet najbardziej złożonych technik biologii molekularnej ale równie swobodnie czuje się sięgając po techniki z zakresu biochemii - zarówno klasycznej jak i zaawansowanej.

Efekty badań doktorantki zostały opisane w rozdziale „Wyniki”. Szereg danych zawartych w tym rozdziale to dane interesujące i nowe dla nauki. Z najważniejsze (i zarazem najbardziej przekonujące) dokonania doktorantki uważam:

- ✚ identyfikację w genomie jądrowym *A. thaliana* szeregu genów - kodujących proteazy funkcjonujące w sposób niezależny od ATP – będących ortologami wcześniej zidentyfikowanych genów kodujących odpowiednie proteazy drożdżowe
- ✚ ustalenie lokalizacji w mitochondriach *A. thaliana* części z proteaz kodowanych przez geny wspomniane w podpunkcie 1

- ✚ wskazanie, że proteaza określona jako AtOMA1 - w odróżnieniu od pozostałych badanych proteaz - ma istotny wpływ na przebieg ontogenezy *A. thaliana* (w szczególności w sytuacji gdy rośliny rosną i rozwijają się w warunkach stresu podwyższonej temperatury) a także na poziom i właściwości funkcjonalne niektórych kompleksów i superkompleksów mitochondrialnego systemu fosforylacji oksydacyjnej, zarówno w temperaturze optymalnej jak i podwyższonej
- ✚ udowodnienie że proteaza AtOMA1 uczestniczy w odpowiedzi roślin na stres oksydacyjny (wywołany działaniem parakwatu) oraz stres osmotyczny (wywołany działaniem mannitolu)
- ✚ ustalenie, że zależna od ATP proteaza AtFtsH4 uczestniczy w regulacji procesów związanych z kształtowaniem się prawidłowej morfologii mitochondriów
- ✚ ustalenie, że proteaza AtFtsH4 uczestniczy w kontroli poziomu kardiolipiny w mitochondriach, zaproponowanie kilku alternatywnych dróg metabolicznych wiążących (w sposób bezpośredni lub pośredni) poziom kardiolipiny z poziomem AtFtsH4 i sformułowanie bardzo atrakcyjnej i dobrze udokumentowanej eksperymentalnie hipotezy tłumaczącej w jaki sposób wyciszenie AtFtsH4 prowadzi do powstawania tzw. mitochondriów olbrzymich, co jest jednym z objawów rozregulowania procesów kształtujących prawidłową morfologię mitochondriów w warunkach braku AtFtsH4

Na tle tych świetnych dokonań doktorantki zwraca jednak uwagę fakt, iż dość liczne fragmenty rozdziału „Wyniki” budzą mniej lub bardziej poważny krytycyzm – przedstawiam je poniżej w formie listy, zobowiązując jednocześnie doktorantkę do udzielenia wnikliwych wyjaśnień na każdy z punktów tej listy w trakcie obrony opiniowanej rozprawy

- 1) Dość trudno zorientować się produkty ilu w istocie genów, zidentyfikowanych przez doktorantkę jako ortologicznych względem genów kodujących proteaz drożdżowe są przedmiotem zainteresowania w omawianej rozprawie ponieważ niemal każdy kolejny podrozdział rozdziału „Wyniki” przynosi dane eksperymentalne o nieco innej populacji tych enzymów a powody dla których tak się dzieje albo nie zostały wyjaśnione albo zostały tak głęboko ukryte w tekście poszczególnych podrozdziałów, że droga prowadząca do zrozumienia o co chodziło doktorantce jest mozolna. Otóż otwierająca rozdział „Wyniki” Tabela 4 (str. 76) przedstawia **osiem proteaz** – produktów ośmiu genów ortologicznych względem genów kodujących proteazy drożdżowe – które doktorantka zidentyfikowała w genomie jądrowym *A. thaliana*. Te proteazy to: AtICP55-1, ICP55-2, OMA1, OCT1, IMP1a, IMP1b, IMP2 oraz ATP23. Ale już w podrozdziale 6.4.1., odległym od Tabeli 4 o zaledwie kilka stron, a poświęconym wynikom badań wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych proteaz zamiast ośmiu odnajdujemy **tylko sześć.. brakuje AtICP55-1 i AtICP55-2** i dopiero po bardzo wnikliwych

poszukiwaniach odnajdujemy w głębi podrozdziału informację, (str. 88) iż nie badano lokalizacji tych proteaz bo zbadat to i opublikował inny zespół badawczy – Carrie i wsp. (2015). Kiedy jednak szukamy konkretnych wyników dotyczących lokalizacji pozostałych sześciu proteaz to odnajdujemy je tylko dla pięciu z nich – tym razem brakuje AtIMP1b i znowu jest potrzebna żmudna praca aby zrozumieć, że danych dla AtIMP1b brakuje dlatego, że żadna z trzech alternatywnych technik badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji nie doprowadziła do uzyskania konkluzyjnych wyników, jednak doktorantka w żadnym miejscu rozprawy nie napisała tego *expressis verbis*. Kolejny podrozdział omawianej rozprawy (6.1.5), odnoszący się do charakterystyki fenotypowej mutantów pozbawionych indywidualnych proteaz przynosi listę (str. 29) enzymów które usiłowano wyciszyć drogą mutagenezy insercyjnej a lista ta **znowu obejmuje osiem pozycji**, włączając w to AtICP55-2 co do której przywołana przez doktorantkę publikacja Carrie i wsp. (2015) dowodzi, że jest to białko jądrowe a więc nie powinno w ogóle interesować doktorantki skoro temat rozprawy mówi wyraźnie o proteazach ważnych dla funkcjonalności mitochondriów. Okazuje się, że doktorantka nie badała fenotypu mutantów pozbawionych AtICP55-2 tylko dlatego, że nie udało się jej pozyskać odpowiednich mutantów insercyjnych w postaci homozygotycznej..

- 2) Rozdział 6.4.1 dotyczący badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji proteaz jest napisany bardzo chaotycznie a śledzenie wyvodu wymaga wielkiej cierpliwości. Doktorantka zastosowała aż trzy różne techniki identyfikacji lokalizacji
- obserwację w mikroskopie konfokalnych zielonego świecenia w izolowanych protoplastach poddanych transfekcji konstruktami kodującymi białka fuzyjne proteaza-GFP
 - obserwację zielonego świecenia w protoplastach stabilnych transformantów zawierających konstrukty kodujące białka fuzyjne proteaza-GFP
 - immunodetekcję peptydu FLAG w mitochondriach stabilnych transformantów zawierających konstrukty kodujące białka fuzyjne proteaza-FLAG.

Wewnątrzmitochondrialną lokalizację poszczególnych proteaz potwierdzono albo dwiema z tych metod (np. AtIMP1a) albo jedną z nich (np. AtATP23) albo nie potwierdzono jej żadną z tych metod (AtIMP1b) ale doktorantka nie zamieściła tabeli która by to jasno podsumowywała opisując te wyniki w trudny do prześledzenia, niejasny sposób.



- 3) Rysunek 33 (str. 96) obrazujący wyniki analizy przebiegu wybranych faz ontogenezy u roślin WT oraz czterech mutantów insercyjnych prezentuje się dość zaskakująco. Jak rozumieć fakt, iż podfaza 1.04 rozpoczyna się u poszczególnych genotypów *A. thaliana* już w zerowym dniu ontogenezy (fenotypowanie w ziemi)? Według klasyfikacji Boyesa i wsp. (2001) - na którą doktorantka się powołuje - podfaza 1.04 jest definiowana jako moment kiedy na siewce pojawia się czwarty liść rozetkowy, moment ten w warunkach dnia długiego następuje zwykle w 12-16 dni po wysianiu nasion do ziemi. Co doktorantka rozumie pod pojęciem „wielkość siewki” i jak mierzono „wielkość siewki”? To dość niejasne pojęcie to zostało użyte na str.97 a w żadnym miejscu pracy nie ma jego definicji.
- 4) W jakim celu do konstruktu używanego dla pozyskania stabilnych rewertantów mutantów insercyjnych pozbawionych genu *AtOMA1* (str. 101) wprowadzono sekwencję kodującą znacznik FLAG skoro obecność tego znacznika nie została przez doktorantkę wykorzystana w procesie identyfikacji rewertantów - ani w reakcji PCR genomowego DNA potencjalnych rewertantów ani w formie detekcji tego znacznika w mitochondriach rewertantów z użyciem przeciwciał anti-FLAG?
- 5) Dlaczego opisując na str. 116 wyniki porównywania profili lipidowych roślin WT i mutantów *rnaiatp23* za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej doktorantka odwołuje się do Rys. 51 i 52 choć Rys. 51 nie zawiera żadnych danych odnoszących się do mutantu *rnaiatp23*?
- 6) Dlaczego doktorantka zdecydowała się wykonać analizy składu lipidowego mitochondriów roślin WT, *rnaiatp23*, *ftshh4* i *ftsh4-rnaiatp23* za pomocą określenia zawartości fosforu oraz za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej (wyniki opisano na str. 114-117) skoro sama ocenia że nie można „stwierdzić o dokładności uzyskanych wyników” (str. 117) i na dalszych stronach rozdziału „Wyniki” (str. 117-124) przedstawia rezultaty analiz wykonanych za pomocą techniki „shotgun” lipidomics?



7 Uzyskane przez doktorantkę wyniki zostały wnikliwie i interesująco przeanalizowane na tle istniejących danych literaturowych w rozdziale „Dyskusja”. Za szczególnie ważne i nowatorskie uważam stworzenie hipotetycznego scenariusza wydarzeń prowadzących u mutantu *ftsH4* do pojawiania się olbrzymich mitochondriów w powiązaniu z bardzo interesującymi rozważaniami odnoszącymi się do zależności między poziomem akumulacji kardiolipiny w mitochondriach i poziomem proteazy AtFtsH4. Dysonansem na tle wysokiego poziomu rozdziału „Dyskusja” jest okoliczność, iż właśnie w tym rozdziale, na str. 131 doktorantka powtarza „słowo w słowo” czternastowierszowy tekst wcześniej umieszczony na str. 90-91 w rozdziale „Wyniki” (tekst ten odnosi się do analizy lokalizacji wewnątrzmitochondrialnej proteaz AtIMP1a, ATP23 i OCT1). Jak doktorantka tłumaczy to powtórzenie?

Podsumowując: stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera dane interesujące, oryginalne i nowe dla nauki. Doktorantka zgromadziła je w rezultacie wykonania znacznej liczby eksperymentów których zaprojektowanie i przeprowadzenie wymagało dogłębnej znajomości biologii molekularnej i biochemii roślin i drożdży a ponadto posiadania wybitnych predyspozycji manualnych. Dokonania te w pełni rekompensują niedostatki i błędy jakie zidentyfikowałem i opisałem we wcześniejszych fragmentach niniejszej opinii.

Działając na podstawie art. 13 **Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw** oceniam, że rozprawa doktorska mgr Renaty Skibior-Błaszczyk spełnia wymogi reprezentowania „oryginalnego rozwiązania problemu naukowego” i może być podstawą do nadania stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. Zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Renaty Skibior-Błaszczyk do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Grzegorz Jackowski