

Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Kierownik Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych
Zakład Biochemii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
w Warszawie

OCENA

Pracy doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk pt. „Poszukiwanie proteaz istotnych dla funkcjonalności i morfologii roślinnych mitochondriów”

Kanoniczny opis mitochondriów dotyczy przede wszystkim ich zdolności do syntezy ATP, czyli ich funkcji energetycznej. Funkcje metaboliczne mitochondriów zostały także dobrze scharakteryzowane kilkanaście lat temu. W latach dziewięćdziesiątych wydawało się, że opis mitochondriów jest kompletny i ich badania można uznać w dużej części za zakończone. Ogłoszono koniec bioenergetyki mitochondrialnej.

Jednak, co nie jest takie rzadkie w badaniach naukowych, kolejne odkrycia wykreowały zupełnie nowe obszary badawcze a jednocześnie umiejscowiły mitochondria w nowym kontekście fizjologicznym. Oto kilka przykładów „nowego kontekstu fizjologicznego mitochondriów” ostatnich lat. Rola cytochromu c i zjawiska apoptozy indukowanej przez mitochondria spowodowały, że obraz tej organelli jako swoistej fabryki różnych substancji został zmieniony na obraz mitochondriów jako ważnego elementu w przekazywaniu sygnałów wewnątrz komórki. Sygnalizacyjna rola reaktywnych form tlenu, choroby mitochondrialne czy wreszcie udział mitochondriów w zjawisku cytoprotekcji zdecydowały o renesansie badań mitochondriów w różnych organizmach modelowych, w tym w roślinach. Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk wpisują się w ten obszar badawczy. Można go najogólniej nazwać: poszukiwanie nowych mechanizmów regulacyjnych obecnych w mitochondriach. Stąd temat recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczy podstawowych zjawisk zachodzących w mitochondriach, zjawisk o fundamentalnym znaczeniu.

Rozprawę mgr Renaty Skibior-Błaszczyk otwiera wstęp omawiający różne aspekty bioenergetyki mitochondriów roślin ze szczególnym uwzględnieniem systemów proteolitycznych. Przedstawiano także zagadnienia dotyczące fuzji i fizji mitochondriów. Wstęp do rozprawy doktorskiej wydaje się recenzentowi wystarczający, aby w

odpowiedni sposób wprowadzić czytelnika w omawiane zagadnienia. W opinii recenzenta Wstęp do rozprawy doktorskiej może zostać wykorzystany do przygotowania artykułu przeglądowego w Postęпах Biochemii.

Główny cel pracy Pani mgr Renaty Skibior-Błaszczyk został zdefiniowany w sposób następujący:

Cel 1: identyfikacja i charakterystyka proteaz niezależnych od ATP w mitochondriach *Arabidopsis Thaliana*,

Cel 2: określenie, czy proteazy AtATP23 oraz FTSH4 biorą udział w regulacji metabolizmu fosfolipidów oraz decydują o morfologii mitochondriów u roślin.

Szczegółowe zadania, zdefiniowane w rozprawie doktorskiej, w obrębie celu 1 dotyczyły:

- określenie lokalizacji sub-komórkowej zidentyfikowanych proteaz na podstawie znanych homologów drożdżowych,
- zbadanie, czy roślinne proteazy wykazują podobne funkcje do odpowiedników drożdżowych,
- wykorzystanie strategii odwrotnej genetyki do zbadania funkcji badanych proteaz niezależnych od ATP u roślin, w tym selekcja i charakterystyka linii roślin pozbawionych proteaz niezależnych od ATP oraz wpływu braku proteazy na funkcjonalność systemu oksydacyjnej fosforylacji.

Szczegółowe zadania w obrębie celu 2 dotyczyły:

- utworzenia roślin z wyciszoną ekspresją proteazy AtATP23,
- przeprowadzenia analizy lipidomicznej mitochondriów roślin z wyciszoną ekspresją AtATP23 oraz pozbawionych proteazy FTSH4,
- zbadania morfologii mitochondriów w badanych mutantach roślinnych.

Tak sformułowane cele według recenzenta są w pełni zasadne. Warto tu podkreślić, że rozprawa była realizowana pod kierunkiem prof. Hanny Jańskiej (promotor pomocniczy dr Małgorzata Czarna) w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki (Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski) gdzie od wielu lat, z dużą ekspertyzą i z wieloma sukcesami naukowymi realizuje się badania dotyczące szeroko rozumianej bioenergetyki molekularnej roślin.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczuk dotyczą ważnego zagadnienia w obszarze badań mitochondriów tzn. dotyczą mechanizmów, które decydują o „białkowym obrazie” w zakresie systemów proteolitycznych obecnych w mitochondriach. W szczególności, w rozprawie doktorskiej opisano wyniki mające na celu identyfikację niezależnych od ATP proteaz decydujących o prawidłowych funkcjach mitochondriów. W kontekście wykorzystywanego modelu doświadczalnego proteazy te decydują o wzroście i rozwoju roślin.

Na podstawie homologów u drożdży zidentyfikowano i scharakteryzowano 6 nieznanych dotychczas niezależnych od ATP proteaz:

- homologa drożdżowej proteazy Oct1: AtOCT1,
- homologa drożdżowej proteazy Oma1: ATOMA1,
- homologa drożdżowej proteazy Icp55: ATICP55,
- homologa drożdżowej proteazy Atp23: AtATP23,
- homologa drożdżowej proteazy Imp2: ATIMP2,
- homologa drożdżowej proteazy Imp1 : AtIMP1a,

Wykazano, że wszystkie badane proteazy obecne są w mitochondriach Arabidopsis. Wykorzystując technikę frakcjonowania mitochondriów wykazano, że podobnie jak w przypadku odpowiedników drożdżowych, AtATP23 znajduje się we frakcji rozpuszczalnej, a AtOMA1 i AtIMP1a we frakcji błonowej. Natomiast AtOCT1, w przeciwieństwie do homologa drożdżowego, zlokalizowany jest we frakcji błonowej. Spośród badanych proteaz tylko dwie (AtOMA1 oraz AtICP55) były zdolne do zastąpienia odpowiedników drożdżowych w testach funkcjonalnej komplementacji. Z wyjątkiem ATOMA1, brak pozostałych zidentyfikowanych proteaz nie wpływał na wzrost i rozwój roślin w warunkach optymalnych. Podobne obserwacje dotyczyły funkcji kompleksów fosforylacji oksydacyjnej.

Brak proteazy AtOMA1 powodował znaczne obniżenie aktywności kompleksu V w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin. Podwyższenie temperatury w czasie wzrostu roślin skutkowało dalszym obniżeniem aktywności kompleksu V (przy niewielkim spadku ilości tego kompleksu). Regulacja aktywności kompleksu V przez proteazę AtOMA1 prawdopodobnie zachodzi na poziomie regulacji proteolitycznej w stosunku do białka krytycznego dla funkcji kompleksu V.

W rozprawie doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk opisano także badania dotyczące wpływu dwóch proteaz (niezależnej od ATP AtATP23 i zależnej od ATP FTSH4) na metabolizm fosfolipidów u Arabidopsis. Otrzymane wyniki wykazały, że tylko FTSH4 wpływa na zmiany profilu lipidowego. I tak zauważono spadek ilości kardiolipiny oraz wzrost fosfatydyloglicerolu i diacyloglicerolu w mitochondriach wykorzystywanych mutantów. Interesujące, że w w/w warunkach obserwowano zmiany w charakterystyce mitochondriów: stawały się one heterogenne tzn pojawiały się duże mitochondria, których nie obserwowano w warunkach kontrolnych.

W rozprawie doktorskiej wykorzystano szeroki wachlarz technik eksperymentalnych:

- zestaw technik biologii molekularnej (izolacja materiału genetycznego, oznaczanie oraz synteza DNA, techniki elektroforetyczne, przygotowanie konstrukcji genetycznych itd.)
- zestaw technik dotyczących badania białek (immunoblotting, elektroforeza także typu blue-native, mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem sond znakujących mitochondria)
- analiza składu lipidowego metodą TLC (technologią Shitgun lipidomics zastosowano w badaniach zmian profilu lipidowego wykonała firma Lipotype z Niemiec)
- procedury transformacji materiału biologicznego.

Zarówno zakres wykorzystanych technik oraz ich opis (szczegółowość i precyzja) w rozprawie doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk recenzent ocenia celująco. Dyskusja obejmująca 17 stron rozprawy jest bardzo dobra. Załączniki opisujące szczegółowo konstrukty genetyczne otrzymane w trakcie pracy doktorskiej wydają się być cenne dla ich dalszego wykorzystania w przyszłych badaniach. Spis literatury według recenzenta jest poprawny i adekwatny. Załączenie odbitek prac już opublikowanych (w Plant Cell oraz Plant Physiology) jest dobrym obyczajem pokazującym, że otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk już są w obiegu światowym. Szczególnie, że wyniki opublikowano w czasopiśmie z wysokim impact factor. Dla Plant Cell jest to 10.529 (IF pięcioletni) co powinno zadowolić najbardziej ortodoksyjnych wyznawców naukometrycznych analiz pracy

naukowców. Czasopismo Plant Physiology posiada impact factor 8.030 i było najbardziej cytowanym czasopismem w roku 2014 tzw. roślinnym. Można tylko pogratulować promotorkom oraz doktorantce opublikowania wyników doktoratu w tak dobrych czasopismach naukowych. Na stronie 187 jest również informacja o jednej pracy w przygotowaniu. Domyślam się, że będzie ona opublikowana w równie bardzo dobrym czasopiśmie międzynarodowym.

Warto podkreślić, że rozprawa doktorska mgr Renaty Skibior-Błaszczyk była finansowana przez dwa projekty Narodowego Centrum Nauki (nr 2011/03/D/NZ1/00562 oraz nr 2013/11/N/NZ3/00061).

Czas na pytania i uwagi krytyczne recenzenta:

- Pytanie natury ogólnej: recenzent ciekaw jest (z racji swoich zainteresowań naukowych) opinii doktorantki dlaczego obserwuje się tak znaczącą różnicę w ilości białek, które konstytuują mitochondria ssacze oraz roślinne? W pierwszym przypadku mówi się o około 1000-1200 białek, a w przypadku roślin ok. 2000 białek.
- Pytanie szczegółowe dotyczące metodyki: Czy wykorzystanie ilościowych narzędzi (oprogramowania analizujące obraz) do badania zmian morfologii mitochondriów nie byłoby korzystniejsze dla prowadzonych analiz? Takie podejście umożliwiłoby ilościowe porównanie otrzymanych wyników dotyczących zmian morfologicznych.
- Opisując zjawisko podziału i łączenia się mitochondriów i udziału w tym procesie proteaz, recenzent ciekaw jest opinii doktorantki na temat wagi innych czynników natury fizykochemicznej immanentnie związanych z mitochondriami: np. potencjału błonowego, gradientu pH, stężenia jonów wapniowych akumulowanych w mitochondriach, reaktywnych form tlenu syntetyzowanych w mitochondriach itp. itd.?
- Jakie były przesłanki wykorzystania określonych sond znakujących mitochondria np. Mitotracker Orange (np. opis rysunku 60 na stronie 127)
- Rozprawa jest napisana bardzo poprawnie i jej czytanie (m.in. Wstępu) było dużą przyjemnością. Ty bardziej chyba trzeba zwrócić uwagę na nieliczne błędy:

- zwrot „... badania nad wpływem...” (strona 8) jest raczej zapożyczeniem z obcego języka.
- na zakończenie jedno pytanie dotyczące zwrotu opisującego aktywność kompleksu IV (strona 18). Jak należy rozumieć sformułowanie „... udział w utlenianiu jonów wodoru tlenem do wody”. Dla recenzenta sformułowanie to jest niezrozumiałe.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Renaty Skibior-Błaszczyk jest napisana bardzo dobrze, otrzymane wyniki są bardzo interesujące a zgłoszone uwagi nie rzutują na moją ogólnie bardzo pozytywną ocenę pracy. Autorka wykazuje bardzo dobrą orientację w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Wnioskuje zatem o uznanie pracy mgr Renaty Skibior-Błaszczyk za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie mgr Renaty Skibior-Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na bardzo interesujące rezultaty uzyskane przez doktorantkę oraz ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Renaty Skibior-Błaszczyk.



Warszawa, 27 styczeń 2017 r.

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)