



Wrocław, 27.10.2016

Prof. dr hab. Grażyna Kłobus
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytetu Wrocławskiego

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Adamowicz zatytułowanej:

„Wpływ zmian mitochondrialnej translacji na globalny transkryptom, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w ekspresji genomu chloroplastowego oraz komunikacji pomiędzy chloroplastami i jądrem.”

Powszechnie przyjmuje się, że fototroficzne komórki eukariotyczne wykształciły się około 2 do 1,7 mld lat temu w wyniku serii niezależnych procesów endosymbiozy. Drogą endosymbiozy pierwotnej, pozbawiona ściany komórkowej ancestralna komórka (najprawdopodobniej archebakteria), najpierw połączyła się z komórką wywodzącą się z α -probakterii, pozyskując w ten sposób mitochondrium, a następnie z komórką pracyanobakterii wyposażając się w chloroplast. W toku procesu pierwotnych symbioz, prowadzących do powstania mitochondriów i plastydów, większość genów białkowych uległa transferowi do jądra. Skutkiem tego około 90% białek mitochondrialnych i ponad 95% białek plastydowych jest kodowana jądrowo i, po syntezie w cytosolu, importowana do organelli. Pozostałe 5-10% białek organelli oraz rRNA, tRNA kodują genomy organellowe. W efekcie takiej heterogenności genetycznej szereg organellowych kompleksów białkowych komórki eukariotycznej wchodzących w skład systemów transkrypcyjnych, translacyjnych i metabolicznych, zawiera podjednostki kodowane przez genom jądrowy jak i organellowy. Z drugiej strony, mitochondria i chloroplasty jako struktury zaangażowane w transformacje energetyczne, spełniają funkcje endogennych sensorów środowiskowych, przesyłając specyficzne sygnały do jądra komórkowego. Sygnały organellowe modyfikując ekspresję genów jądrowych inicjują fizjologiczną adaptację organizmu do zmiennych warunków. Jest oczywiste, że zarówno regulacja proteomu i stechiometrii kompleksów białkowych organelli przez genom jądrowy (sygnały następcze) jak i modyfikacje metaboliczne, wzrostowe i rozwoju inicjowane sygnałami organellowymi (sygnały wsteczne) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe wymagają sprawnej komunikacji pomiędzy przestrzennie izolowanymi jądrem i organellami. Przedstawiona mi do oceny praca analizuje szlaki takiej komunikacji wpisując się w tę aktualną i ważną tematykę. Została ona wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Jańskiej. Praca jest ściśle związana z głównym nurtem badań Zespołu, ale, co szczególnie cenne, wprowadza do nich istotny element nowości, jakim jest komunikacja wewnątrzkomórkowa.

Praca doktorska Anny Adamowicz (196 stron, 63 rycin i 12 tabele), składająca się z 6 rozdziałów i materiałów uzupełniających (11 załączników, spisu literatury) ma układ typowy dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. Umieszczono w niej także wykaz współautorskich publikacji (1 praca opublikowana i jedna przygotowana do druku), a także szczegółowe dane o konferencyjnych prezentacjach wyników (w sumie 9) i źródłach finansowania badań (4). Pracę przygotowano w języku polskim, załączając anglojęzyczne streszczenie.

Obszerny **Wstęp** pracy (42 stron) podzielony na pięć podrozdziałów przedstawia w sposób uporządkowany i wyczerpujący aktualną wiedzę dotyczącą podjętego tematu. Można go podzielić na dwie części tematyczne. Pierwszą, merytorycznie wprowadzającą w tematykę badawczą pracy, rozpoczyna krótki podrozdział przedstawiający hipotezę endosymbiotycznego pochodzenia roślinnych mitochondriów i chloroplastów. Kolejne podrozdziały tej części poświęcone mitochondriom i chloroplastom omawiają najpierw budowę i funkcje mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów oraz strukturę i regulację aktywności oksydazy alternatywnej

w powiązaniu z produkcją sygnałów redoks, mityribosomy i ich rolę w regulacji translacji mitochondrialnej oraz fenotypowe efekty mutacji genów kodujących białka mityribosomalne, ze szczególnym uwzględnieniem mutantów *rps10*, obiektu badawczego Doktorantki. Następnie przedstawiono strukturę genomu chloroplastowego i jego transkrypcję przy udziale polimerazy kodowanej chloroplastowo (PEP) oraz dwóch polimeraz kodowanych jądrowo (NEP), regulację transkrypcyjną i posttranskrypcyjną tego procesu oraz proces translacji i na koniec strukturę kompleksów fotosyntetycznych. Ostatni, dla mnie najbardziej interesujący rozdział, pierwszej części wstępu, analizuje szlaki komunikacji pomiędzy jądrem, mitochondriami i chloroplastami. Doktorantka w oparciu o najnowszą literaturę szczególnie dokładnie omówiła drogi wstecznej komunikacji pomiędzy mitochondriami lub chloroplastami a jądrem komórkowym, wskazując na potencjalne cząsteczki sygnałowe, a także komunikację pomiędzy mitochondriami i chloroplastami.

Druga, znacznie krótsza część wstępu dotyczy techniki mikromacierzy pozwalającej na charakterystykę tzw. globalnego transkryptomu i omawia zarówno rodzaje mikromacierzy jak i metody analizy uzyskanych danych. Ponieważ techniki mikromacierzy stanowiły jedną z metod użytych w pracy, moim zdaniem, te informacje mogłyby znaleźć się w Materiałach i Metodach, wtedy Wstęp stanowiłby płynne wprowadzenie do celu pracy.

Celem pracy było określenie zmian w transkryptomie *A. thaliana* z wyciszoną ekspresją genu *RPS10* kodującego mitochondrialne białko rybosomalne. Autorka założyła, że szeroka analiza funkcjonalna i subkomórkowa danych uzyskanych z mikromacierzy, porównanie tych danych z opublikowanymi transkryptomami innych mutantów mitochondrialnych oraz walidacja techniką ilościowego PCR wybranych na tej podstawie, najbardziej interesujących danych z mikromacierzy umożliwi wnioskowanie o wpływie zaburzeń w translacji mitochondrialnej na procesy zachodzące w innych kompartmentach komórkowych, szczególnie w chloroplastach.

W rozdziale **Materiały i Metody** znalazł się szczegółowy opis warunków uprawy roślin oraz zróżnicowanych metod użytych w doświadczeniach obejmujących izolację kwasów nukleinowych, reakcje odwrotnej transkrypcji, PCR i PCR w czasie rzeczywistym, izolacje mitochondriów, chloroplastów i błon tylakoidowych, techniki elektroforetyczne, Western blotting, translację „*in organello*” i „*in vivo*”, pomiary tempa transkrypcji „*run on*”, a także metody pomiaru aktywności oddechowej wyizolowanych mitochondriów i liści, parametrów fluorescencji chlorofilu umożliwiające szacowanie wydajności fotosystemów, metody szacowania starzenia się liści, czy odporności roślin na suszę. Opisano także metodę globalnej analizy transkryptomu wykonaną w laboratorium Analiz Mikromacierzy PAN w Warszawie i stosowane metody bioinformatyczne. Uważam, że zarówno obiekt badawczy (dzięki rośliny *A. thaliana* i mutanty z wyciszoną ekspresją genu *RPS10* kodującego białko S10, jedno z białek małej podjednostki rybosomalnej) jak i zróżnicowane metody zostały dobrane w sposób właściwy, umożliwiając realizację założeń pracy.

Wyniki opisane na 71 stronach i zilustrowane 58 rycinami oraz 2 tabelami, to materiał, który z powodzeniem wystarczyłby na dwie odrębne prace doktorskie. Merytoryczna zawartość rozdziału poświadcza, że recenzowana rozprawa nie ma charakteru przyczynkarskiego (fenomenologicznego), lecz jest dogłębną analizą poważnego problemu naukowego. Badania przeprowadzono w logicznie ułożonych etapach, z których każdy rozpoczyna kilka zdań uzasadniających i kończy krótkie podsumowanie, co czyni całość logiczną i spójną. Z uwagi na ogrom prezentowanych wyników ograniczę się do wypunktowania najistotniejszych.

1. Udowodniono, że efektem wyciszenia jądrowego genu *RPS10* kodującego jedno z białek małej podjednostki rybosomalnej w mitochondriach jest zaburzona biogeneza mityribosomów, co prowadzi do modyfikacji mitochondrialnej translacji przejawiającej się wyższym poziomem białek mityribosomalnych oraz obniżonym poziomem białek kompleksów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów/syntazy ATP.
2. Wykazano (na podstawie analizy danych z mikromacierzy), że wyciszenie genu *RPS10* powoduje także globalne zmiany w poziomie transkryptów genów jądrowych należących do 7 grup funkcyjnych,

m.in. : stresu biotycznego, mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów/syntazy ATP, ściany komórkowej i metabolizmu lipidów.

3. Wykonano porównawczą analizę transkryptomu mutantów *rps10* z 26 transkryptomami innych mutantów mitochondrialnych i znaleziono najwyższe podobieństwo do transkryptomu podwójnego mutantu *aox1a:rpoTmp* z uszkodzeniami w obrębie genów kodujących oksydazę alternatywną i polimerazę RNA mitochondrialną/chloroplastową.
4. Pokazano, że obydwaj mutanty charakteryzuje obniżona aktywność cytochromowej i alternatywnej drogi oddychania mitochondrialnego i wyjaśniono, że u mutantów *rps10* spadek aktywności drogi cytochromowej wynika z zaburzeń translacji mitochondrialnej i mniejszej ilości kompleksów łańcucha transportu elektronów (OXPHOS), a obniżenie alternatywnej drogi oddychania z modyfikacji posttranslacyjnych.
5. Dowiedziono, że spadek cytochromowego i alternatywnego oddychania mitochondrialnego u mutantów *rps10* prowadzi do obniżenia aktywności transkrypcyjnej chloroplastów, a sygnały przesyłane z mitochondriów do chloroplastów powstają na skutek zahamowania kompleksu IV i oksydazy alternatywnej.
6. Zidentyfikowano także dalsze etapy kaskady sygnałnej pokazując, że obejmują one polimerazę kodowaną jądrowo (NEP) i chloroplastowo (PEP), białka pTAC i czynniki sigma.
7. Udowodniono, że zaburzenia transkrypcji chloroplastowej w komórkach mutantu *rps10* skutkują obniżeniem syntezy tetrapiroli inicjując odpowiedź wsteczną w genomie jądrowym i zahamowanie transkrypcji genów kodujących chloroplastowe białka fotosyntetycznie aktywne.

Ponadto:

8. Udowodniono eksperymentalnie, że aktywacja genów odpowiedzi na stres biotyczny u mutantu *rps10* obserwowana nawet bez ataku patogenów, jest związana z akumulacją kwasu salicylowego.
9. Wyjaśniono, że podwyższony poziom kwasu indukuje ekspresję genów warunkujących odporność na patogeny, oraz na zamykanie aparatów szparkowych.
10. Pokazano, że inicjowane kwasem salicylowym zamykanie tych struktur nie tylko podnosi odporność na patogeny ale, ograniczając skutecznie transpirację, nadaje mutantom *rps10* cechy odporności na stres suszy.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji części doświadczalnej rozprawy doktorskiej zostały zwięzłe (10 stron) acz wnikliwie i rzeczowo omówione w **Dyskusji**. Po analizie tej części rozprawy z uznaniem pragnę podkreślić, że Doktorantka wykazała się dużą wnikliwością i dojrzałością naukową. Do tej części pracy nie wnoszę uwag. Uważam natomiast, że ostatni rozdział zatytułowany **Podsumowanie** jest właściwie streszczeniem pracy wzbogaconym o elementy dyskusji. Zdaje sobie sprawę, że przy tak szerokich i wielowątkowych badaniach, sformułowanie wniosków wymagałoby znacznie większego trudu, ale upieram się, by Doktorantka podjęła to zadanie i przedstawiła je podczas publicznej obrony pracy.

Po przeczytaniu pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi; do Doktorantki:

1. Proszę o wyjaśnienie, co Autorka miała na myśli pisząc na str. 85... "Do grupy tej należą dwa geny które wchodzi w skład rodziny białek kodujących transferazę endogluukanu *XTR3* i ksylogluukanu *EXGT*, biorących udział w łączeniu cząsteczek glukanu/ksylogluukanu w syntezie celulozy" i jaka jest rola obydwu transferaz w syntezie celulozy?
2. W jaki sposób może Pani wyjaśnić powiązanie pomiędzy biogenezą aparatów szparkowych a stanem ich zamknięcia w kontekście działania kwasu salicylowego?

Na koniec krótka ocena edytorskiej strony rozprawy. W znaczącej części jest ona przygotowana starannie, także pod względem ilustracyjnym. Podobały mi się schematy zwłaszcza te zamieszczone w dyskusji, ładnie

podsumowujące uzyskane wyniki. Jakkolwiek praca, pomimo że opisuje złożone zagadnienia, co nie jest sprawą prostą, napisana jest jasnym, w miarę poprawnym językiem, to jednak Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów stylistycznych i licznych interpunkcyjnych. Najbardziej rażące to: „gen kodowany w genomie”... (mitochondrialnym, jądrowym), np. str. 12, 13, 152 ; „zmiany w poziomie transkryptów genów kodowanych chloroplastowo” str. 126 i „...poziom transkryptów genów chloroplastowych kodowanych jądrowo” str.156. Ponadto w pracy zabrakło odrębnego wykazu skrótów ze stosownymi objaśnieniami, co znacznie utrudniało czytanie pracy.

Konkluzja

Reasumując, uważam, że rozprawa mgr Anny Adamowicz ma charakter oryginalnej pracy naukowej i spełnia wszelkie wymogi stawiane dysertacji doktorskiej. Autorka wykazała duże kompetencje merytoryczne i doskonałą znajomość literatury dotyczącej opracowywanego tematu, dobre opanowanie różnorodnych i trudnych metod badawczych oraz umiejętność krytycznej oceny i wartościowania uzyskanych wyników. Układ pracy, a zwłaszcza dobór odpowiednich obiektów badawczych i metod oraz sekwencja przeprowadzonych analiz dowodzą, że badania zaplanowano i wykonano z pełną świadomością osiągnięcia założonych celów i rzetelną troską o wiarygodność wyników. Wobec powyższego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter pracy, staranność planowania i wykonania doświadczeń, a także jakość dokumentacji uzyskanych wyników, przedkładam Radzie Wydziału Biotechnologii UWr wniosek o wyróżnienie pracy nagrodą.


prof. dr hab. Grażyna Kłobus