



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Umultowska 89
61-614 Poznań

Poznań, 6.09.2016

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Aleksandry Adamowicz
p.t. „Wpływ zmian w mitochondrialnej translacji na globalny transkryptom,
ze szczególnym uwzględnieniem zmian w ekspresji genomu chloroplastowego oraz
komunikacji pomiędzy chloroplastami i jądrem”**

Komunikacja pomiędzy posiadającymi własny genom organellami i jądrem jest intensywnie badana w komórkach roślinnych ale nasza wiedza na temat takiej komunikacji wywołanej zaburzeniem mitochondrialnej translacji jest niewielka. Praca doktorska mgr Aleksandry Adamowicz stanowi szeroką analizę wpływu zmian w mitochondrialnej translacji wywołanej wyciszeniem ekspresji genu *RPS10*, kodującego białko małej podjednostki mityriobosomów, na globalny transkryptom komórek roślinnych oraz komunikację pomiędzy mitochondriami, jądrem i chloroplastami. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Hanny Jańskiej oraz przy udziale promotora pomocniczego dr Małgorzaty Kwaśniak-Owczarek z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, a więc w uznanym na świecie ośrodku od lat specjalizującym się w badaniu funkcjonowania mitochondriów roślinnych. Materiałem badawczym w ocenianej pracy były rośliny typu dzikiego oraz mutanty, głównie mutanty *rps10* (fenotypy P2 i P3), rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana*. Zmiany transkryptomu badano analizując dane z mikromacierzy, które były uzupełniane analizą PCR w czasie rzeczywistym. Przeprowadzono też szereg badań funkcjonalnych, które weryfikowały i uzupełniały dane transkryptomowe. Na wstępie, poprzez funkcjonalną klasteryzację genów wspólnie zmienionych u mutantów *rps10*, scharakteryzowano ogólny obraz zmian w transkryptomie *A. thaliana* wywołanych zaburzeniem translacji na poziomie mityriobosomów. Szczegółowej analizie poddano procesy związane ze wzrostem poziomu kwasu salicylowego, tj. odpowiedź obronną przeciwko patogenom, starzenie się i tolerancję na suszę oraz biogenezę aparatów szparkowych. Następnie porównano transkryptom mutantów *rps10* z 26 znanymi i dostępnymi transkryptomami (dane mikromacierzowe) innych mitochondrialnych mutantów *A. thaliana*. Szczegółnej analizie poddano podobieństwo zmian w mitochondriach mutantów *rps10* i podwójnego mutantu z zaburzoną ekspresją alternatywnej oksydazy i polimerazy RNA podwójnie kierowanej do chloroplastów i mitochondriów (mutant *aox1a:rpoTmp*). W mutantach tych badano konsekwencje obniżonej aktywności oddychania mitochondrialnego poprzez drogę cytochromową i oksydazę alternatywną na funkcjonowanie chloroplastów, głównie poprzez zmiany w aparacie transkrypcyjnym tych organelli. Prowadząc doświadczenia z roślinami typu dzikiego traktowanymi inhibitorami mitochondrialnego łańcucha oddechowego badano wywołane zmiany w transkrypcji chloroplastów. Na koniec, zbadano konsekwencje obniżonej efektywności chloroplastowej transkrypcji w mutantach *rps10*.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest bardzo ładnym i jasnym językiem. W całej pracy można znaleźć nieliczne literówki i drobne błędy stylistyczne. Na wyróżnienie zasługuje staranna i ładna oprawa graficzna pracy.
Zastrzeżenia redakcyjne:

- brak spisu stosowanych skrótów, który znacznie ułatwiłby czytanie tak obszernej pracy;
- nie zawsze wyjaśniono wszystkie skróty i symbole zastosowane na rysunkach (np. Rys. 1.11 i Tabela 1.4);
- niejednolite przedstawienie bibliografii;
- legendy powinny znajdować się na tej samej stronie co rysunki i tabele, chyba że te są zbyt duże;
- wielokrotne używanie zwrotu pomiar aktywności oddechowej „na liściach i mitochondriach” zamiast „w liściach i mitochondriach lub liści i mitochondriów”.

Praca jest bardzo obszerna, liczy w sumie 196 stron. Zawiera 63 ryciny oraz 17 tabel. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele badań, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, 12 załączników (w tym 3 na dołączonej płycie CD), oraz liczącą około 360 pozycji bibliografię, w większości złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. Na końcu rozprawy umieszczono dorobek naukowy Autorki, z jedną publikacją w *Plant Cell* (IF > 10) i 9 doniesieniami konferencyjnymi, oraz spis projektów badawczych, w których Doktorantka brała udział.

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 31 stron Wstęp stanowi obszerny przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego funkcjonowania mitochondriów i chloroplastów roślinnych, ze szczególnym uwzględnieniem komunikacji między tymi organellami a jądrem komórkowym. We Wstępie Doktorantka omówiła także badanie transkryptomu przy użyciu techniki mikromacierzy, zwracając szczególną uwagę na bioinformatyczną analizę danych mikromacierzowych. Lektura tego rozdziału przekonuje o dużej wiedzy Autorki i znajomości piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

Uwagi i pytania do Wstępu:

- Czy rzeczywiście mitochondrialny Kompleks II nie jest białkiem transbłonowym (str. 16 i rysunki przedstawiające mitochondrialny łańcuch oddechowy)?
- Zastanawia mnie przypisanie białka rozprzęgające do alternatywnego szlaku transportu elektronów w mitochondriach (str. 17 i 35)?

Rozdział Materiały i Metody (26 stron) zawiera opisy stosowanych przez Doktorantkę metod badawczych. Uwagę zwraca różnorodność stosowanych technik, świadcząca o dużej wszechstronności i biegłości w pracy doświadczalnej a także analizie bioinformatycznej. Na szeroki wachlarz metod i technik badawczych wykorzystanych w pracy składają się m. in.: hodowla roślin na różnych podłożach; izolacja i oznaczanie ilościowe frakcji subkomórkowych i kwasów nukleinowych; techniki rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych i białek, w tym rozdział białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i natywnych (Green Native Page); identyfikacja białek za pomocą immunodetekcji; badanie translacji „*in organello*” i „*in vivo*”; pomiar aktywności oddechowej w liściach i izolowanych mitochondriach; badania funkcjonalne starzenia się i odporności roślin na suszę; wreszcie analiza transkryptomu przy użyciu mikromacierzy. Doktorantka zaznaczyła, które badania zostały wykonane we współpracy z innymi ośrodkami (np. określanie zawartości jądrowego DNA, ilościowe oznaczenie poziomu kwasu sjałowego, pomiar fluorescencji chlorofilu czy obserwacje mikroskopowe aparatów szparkowych).

Uwagi i pytania do rozdziału Materiały i Metody:

- Nie scharakteryzowano 2 użytych w badaniach fenotypów mutantów *rps10* (P2 i P3) oraz nie wyjaśniono dlaczego badano je oba.
- Punkty 3.2.7.1 i 3.2.7.3 dotyczą tego samego.

- Analizę statystyczną omówiono tylko dla bioinformatycznej analizy danych mikromacierzowych. Nie napisano czy wyniki innych badań opracowanych testem *t*-Studenta przedstawione jako średnie \pm SD czy \pm SE.

W najobszerniejszym rozdziale Wyniki, który obejmuje 73 strony (!), Autorka rozprawy rzeczowo przedstawia wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych umiejętnie zestawionych w rozdziale Cele pracy. Wyniki zilustrowano 50 rysunkami oraz 5 tabelami. Po każdym podrozdziale Autorka umieszcza krótkie podsumowanie, które porządkuje przedstawione wyniki, co ułatwia lekturę tej części pracy zwłaszcza, że bardzo duża ilość informacji stanowi wyzwanie dla czytelnika a interpretacja zebranych wyników nie jest zawsze łatwa. Autorka umiejętnie podtrzymuje zainteresowanie czytelnika uzyskanymi wynikami, które prezentowane w logicznej kolejności tworzą spójną całość. Wydaje się, że najbardziej czasochłonną i wymagającą była dla Doktorantki porównawcza analiza transkryptomyczna obejmująca: (i) funkcjonalną klasteryzację genów zmienionych u mutantów *rps10* w stosunku do roślin typu dzikiego, (ii) porównanie transkryptomu mutantów *rps10* z 26 dostępnymi transkryptomami innych mitochondrialnych mutantów *A. thaliana*, zwłaszcza porównanie mitochondrialnego i chloroplastowego transkryptomu mutantów *rps10* i *aox1a:rpoTmp*, oraz (iii) analizę zmian w transkrypcji chloroplastów wywołanych hodowlą roślin typu dzikiego z inhibitorami łańcucha oddechowego. Warto podkreślić, że połączenie dużej liczby wyników analizy globalnego transkryptomu, ze szczególnym uwzględnieniem transkryptomów organellowych, z wynikami badań morfologiczno-rozwojowych i funkcjonalnych było niezwykle trudne i wymagało dużej wiedzy na temat szeroko pojętej biologii komórek roślinnych. Pozwoliło to na scharakteryzowanie zrębów komunikacji jądro-mitochondria-chloroplasty, która ma miejsce przy zaburzeniu mitochondrialnej translacji komórek roślinnych. Tak na przykład, bardzo ciekawa jest proponowana, w oparciu o przeprowadzone w pracy badania, ścieżka indukcji u mutantów *rps10* genów kodujących białka PR i PDF, a więc białek związanych zwykle z odpowiedzią roślin na stres biotyczny, poprzez szlak metabolizmu kwasu sjałowego. Bardzo interesujące jest także zaobserwowane uruchamianie podobnej ścieżki sygnalizacyjnej w ramach odpowiedzi wstecznej z mitochondriów do jądra podczas zaburzenia mitochondrialnej translacji oraz aktywności oddechowej mitochondriów. Analiza transkryptomyczna i badania przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym na mutantach *rps10* i *aox1a:rpoTmp* oraz badania roślin typu dzikiego hodowanych z inhibitorami łańcucha oddechowego wskazują, że zahamowanie cytochromowego i alternatywnego oddychania mitochondriów jest sygnałem dla zmniejszenia poziomu transkryptów genów kodowanych w chloroplastach.

Uwagi i pytania do rozdziału Wyniki:

- Rys. 4.2 i Tabela 4.1. Dobrze by było zachować jeden kod kolorów: czerwony – wzrost a niebieski – spadek, tak jak w dalszej części pracy.
- Na stronie 76 wymieniono 7 genów, które wykazywały odmienny profil ekspresji w fenotypach P2 i P3. Co to za geny i czym spowodowana jest ta różnica?
- Rys. 4.23A. W liściach mutantów *rps10* obserwowano znaczny wzrost zużycia tlenu poza mitochondrialnym łańcuchem oddechowym (tj. w obecności inhibitorów drogi cytochromowej i alternatywnej). Jak można to wytłumaczyć? Czy badano pojemność drogi cytochromowej, tj. oddychanie w obecności galusanu *n*-propylu, inhibitora oksydazy alternatywnej? W dalszej części rozprawy Autorka mówi o obniżeniu aktywności drogi cytochromowej a przecież nie pokazano bezpośrednio takiego obniżenia.
- Brakuje informacji, które fenotypy mutantów *rps10* brano do badań aktywności oddechowej liści i izolowanych mitochondriów (Rys. 4.23).

- Rys. 4.23B. Wobec zaproponowanego wytłumaczenia, że obniżenie aktywności oksydazy alternatywnej w mitochondriach mutantów *rps10* (mimo istotnej nadekspresji enzymu) wynika z ograniczonej dostępności aktywatora – pirogronianu (punkt 4.3.3), warto by porównać aktywację oksydazy alternatywnej przez ten kwas (tj. odporne na cyjanek oddychanie przy braku i w obecności aktywatora) w stosunku do mitochondriów kontrolnych. Czy porównanie transkryptomu mutantów *rps10* i roślin typu dzikiego nie ujawniło różnic w poziomie transkryptów genów kodujących transporter(y) pirogronianu do macierzy mitochondrialnej?
- Str. 117. Autorka pisze o „braku znaczących zmian w ilości pirogronianu w mitochondriach mutantów *rps10*” a przecież w fenotypie P3 można zaobserwować istotny statystycznie, około 20% spadek (Rys. 4.27B).
- Czy podczas immunodetekcji oksydazy alternatywnej stosowano kontrolę ilości nałożonych mitochondriów (immunodetekcja białka markerowego mitochondriów) zwłaszcza, że poziom zanieczyszczenia frakcji mitochondrialnych mógł być różny dla mutantów *rps10* i roślin kontrolnych.
- Badając komunikację mitochondria-jądro-chloroplasty analizowano zmiany w chloroplastowej transkrypcji w odpowiedzi na, indukowane hodowlą roślin typu dzikiego z inhibitorami łańcucha oddechowego, zaburzenia w cytochromowej i alternatywnej drodze mitochondrialnego oddychania. Czy zmiany te są podobne w przypadku chloroplastowej transkrypcji mutantów *rps10*? Czy nie warto było zbadać zmiany w mitochondrialnej transkrypcji w porównaniu z danymi uzyskanymi dla mutantów *rps10*? Dlaczego do doświadczeń z hodowlą roślin wybrano mało specyficzny inhibitor oksydazy alternatywnej (zwłaszcza w badaniach na całych komórkach) czyli kwas salicylohydroksamowy?
- Interpretując wyniki badań hodowli roślin z inhibitorami łańcucha oddechowego należy pamiętać, że użycie cjanku (w obecności kwasu salicylohydroksamowego) oznacza obniżenie aktywności wszystkich kompleksów tego łańcucha a nie tylko kompleksu IV.

Liczący 11 stron rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje problemy wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych grup badawczych. Należy także podkreślić, że Doktorantka krytycznie opisała problemy związane z interpretacją i uogólnianiem zebranych wyników zarówno w rozdziale Dyskusja, jak i we wcześniejszym rozdziale Wyniki. Podsumowania nie zawsze były łatwe wobec ogromu otrzymanych danych. Doktorantka wielokrotnie zaznaczała kierunki dalszych badań i co należy jeszcze zrobić w podjętym przez nią temacie. Po Dyskusji umieszczono Podsumowanie, które w związku sposób przypomina i porządkuje najważniejsze wyniki i osiągnięcia, a jest ich bardzo dużo.

Uwagi i pytania do tej części pracy:

- Moim zdaniem, ponieważ elementy dyskusji otrzymanych wyników z danymi literaturowymi znajdują się już w rozdziale Wyniki (i są tam potrzebne), rozdział ten powinien nazywać się Wyniki i Dyskusja a obecny rozdział Dyskusja – Dyskusja Ogólna.
- Str. 148. Niezgrabnie przetłumaczono nazwę białka AtOM66. Według mnie „ATPaza zewnętrznej błony mitochondrialnej” a nie „zewnętrzna membranowa mitochondrialna ATPaza”.
- Patrząc na schemat indukcji odpowiedzi na stres biotyczny, który zaproponowano dla mutantów *rps10* (Rys. 5.1), zastanawiam się czy sugerowany stres oksydacyjny był odzwierciedlony na poziomie transkrypcji genów kodujących mitochondrialne białka antyoksydacyjne (oprócz omówionej oksydazy alternatywnej). Czy w mutantach *rps10* rośnie mitochondrialna produkcja reaktywnych form tlenu?



Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki doświadczeń przedstawione w rozprawie nie tylko stanowią znakomitą podstawę dla bardzo dobrej/dobrych publikacji a także dla dalszych bardzo interesujących badań. Przedstawiona praca wnosi istotne elementy dla zrozumienia komunikacji i wzajemnej regulacji pomiędzy organellami komórek roślinnych dysponującymi własnym genomem. Biorąc pod uwagę (i) merytoryczną i innowacyjną wartość pracy związaną z szeroką analizą wpływu zmian w mitochondrialnej translacji na globalny transkryptom komórek roślinnych i komunikację pomiędzy mitochondriami, jądrem i chloroplastami, (ii) dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także (iii) umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 18.03.2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Ponadto, stwierdzam, że dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Wniosuję zatem o dopuszczenie mgr Aleksandry Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie recenzowanej rozprawy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz