INTERNATIONAL INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY IN WARSAW

CENTRE OF EXCELLENCE IN MOLECULAR BIO-MEDICINE

Dr hab. Agnieszka Chacińska, Prof. nadzw.
Kierownik Laboratorium Biogenezy Mitochondriów
Międzynarodowy Instytut
Biologii Molekularnej i Komórkowej

Warszawa, 20.09.2013

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pani mgr Małgorzaty Kwaśniak

„Dialog mitochondrialno-jądrowy w odpowiedzi na zaburzenia translacji mitochondrialnej u *Arabidopsis*"

wykonanej w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Jańskiej

Rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Kwaśniak przedstawia badania ukierunkowane na poznanie wzajemnych powiązań pomiędzy ekspresją genów mitochondrialnych i jądrowych. Jest to problem istotny, ponieważ u wszystkich organizmów eukariotycznych kompleksy łańcucha oddechowego są zbudowane z komponentów białkowych, kodowanych przez oba genomy, jądrowy i mitochondrialny. Eksperymenty zawarte w rozprawie wykonane są na roślinie *Arabidopsis thaliana*.

Formalny opis rozprawy

Główna część pracy liczy 165 stron. Po niej następuje seria dołączonych publikacji, których Doktorantka jest autorem. Główna część pracy ma klasyczną strukturę. Rozpoczyna ją spis treści, oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Oba streszczenia w sposób przejrzysty i jasny podsumowują cel badań w kontekście stanu naszej wiedzy, główne wyniki oraz wnioski wypływające z wykonanych eksperymentów. Obszerny wstęp wprowadza czytelnika w problematykę podjętą w pracy doktorskiej, a dotyczącą mechanizmów ekspresji genomu mitochondrialnego, oraz jego komunikacji z genomem jądrowym dla osiągnięcia wspólnego zadania, jakim jest sprawne zbudowanie kompleksów oddechowych wewnętrznej błony mitochondrialnej. Następnie Doktorantka formułuje wyznaczony sobie cel pracy badawczej, przedstawiając równocześnie listę zadań, które mają do tego celu doprowadzić. Kolejny, 23-stronicowy rozdział to Materiały i Metody. Rozdział opisujący wyniki jest zawarty na 42 stronach. Praca kończy się 9-stronicową dyskusją i

podsumowaniem. Dodatkowo w pracy zamieszczone są załączniki, tabelka zawierająca sekwencje starterów użytych w pracy i dwie tabelki z danymi, a także obszerny spis literatury (15 stron; więcej niż 100 pozycji). Wstęp, Materiały i Metody oraz Wyniki są podzielone na wiele podrozdziałów i opatrzone rycinami. Struktura pracy jest przejrzysta i uporządkowana, co znacznie ułatwia czytanie pracy. Klasyczną część pracy kończy krótkie podsumowanie dorobku naukowego uwzględniające listę publikacji, doniesienia konferencyjne, udział w grantach, staże naukowe poza macierzystym laboratorium oraz cztery załączone publikacje Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Obszerny Wstęp pracy rozpoczyna się omówieniem funkcji oraz pochodzenia mitochondriów, a także ich budowy i dynamiki ze szczególnym uwzględnieniem mitochondriów roślinnych, które są obiektem badawczym tej pracy. Następnie Autorka opisuje budowę genomów mitochondrialnych roślin porównując je do zwierząt, w tym człowieka, oraz do prostego modelowego organizmu drożdży *S. cerevisiae*. Z tej części dowiadujemy się między innymi, że u *Arabidopsis* mtDNA koduje zdecydowanie więcej rodzajów RNA i białek niż genomy mitochondrialne drożdży czy człowieka. Następnie opisane zostały mechanizmy zaangażowane w regulację ekspresji roślinnego genomu mitochondrialnego, obejmujące procesy replikacji, rekombinacji oraz naprawy DNA, z uwzględnieniem białek biorących w nich udział. Kolejnym etapem w ekspresji genów jest powstanie dojrzałych cząsteczek RNA. Autorka szczegółowo omawia procesy transkrypcji i dojrzewania (*splicing*, *editing*, obróbka końców 5' i 3') różnych klas mitochondrialnego RNA, również w kontekście wiedzy zgromadzonej dla innych organizmów. Na podstawie doniesień literaturowych Doktorantka podejmuje się próby oszacowania, jaki jest wpływ poszczególnych etapów na obecność i ilość produktu finalnego. Omówienie powyżej wymienionych procesów jest niezmiernie istotne, ponieważ genom mitochondrialny *Arabidopsis* poza klasycznymi komponentami białkowymi łańcucha oddechowego koduje wiele elementów aparatu translacyjnego, takie jak tRNA, rRNA, jak również białka rybosomalne. Właściwe przedstawienie swoich własnych badań niewątpliwie wymaga dość szczegółowego omówienia tych istotnych procesów.

W kolejnym rozdziale Wstępu opisane zostały poszczególne etapy translacji. W tej części pozwolę sobie na krytykę: brakuje mi podstawowego opisu i ilustracji jak wygląda rybosom, o którego strukturze i działaniu wiemy bardzo dużo (między innymi z prac Laureatów Nagrody Nobla w dziedzinie chemii z roku 2009 (V. Ramakrishnan; T.A. Steitz i A.E. Yonath)). Doktorantka skupia się na różnicach, które są co najmniej tak samo istotne, jak fundamentalne aspekty omawianych procesów. Białko S10 małej podjednostki rybosomu, którego funkcję Doktorantka zbadała, jest białkiem zachowanym ewolucyjnie. W pracy rzeczywiście wspomniano o jego bakteryjnym ortologu, zabrakło jednak szerszego

podsumowania czy schematów, pokazujących zachowanie ewolucyjne w obrębie rybosomów typu bakteryjnego, a także rybosomów typu eukariotycznego. Ważny dla dalszego zrozumienia pracy jest opis wydarzeń potranslacyjnych, w szczególności tych dotyczących degradacji białek mitochondrialnych. Ten aspekt został przedstawiony bardzo dobrze.

Dalsza część wstępu poświęcona jest opisaniu zjawiska komunikacji pomiędzy mitochondriami a jądrem oraz koordynacji ekspresji genów mitochondrialnych i genów jądrowych, kodujących białka mitochondrialne. Koordynacja procesów ekspresji obu genomów była postulowana od dawna, ponieważ właściwie u wszystkich organizmów eukariotycznych łańcuchy oddechowe odpowiedzialne za generowanie energii w komórce są zbudowane z białek kodowanych przez oba genomy. Podobna sytuacja dotyczy rybosomów mitochondrialnych w wielu organizmach, w tym *Arabidopsis*. Autorka zaznacza, że koordynacja ta jest słabo poznana u roślin, i wydaje się, że badania innych organizmów są fragmentaryczne i ciągle dalekie od dostarczenia pełnego obrazu. Doktorantka omawia również prace, które sugerują bardzo interesującą możliwość istnienia strukturalnie różniących się od siebie pul rybosomów oraz ich potencjalnej roli regulacyjnej przez preferencje do różnych mRNA. Obszerny i przejrzyście napisany wstęp świadczy o posiadaniu dobrej znajomości tej dyscypliny nauki.

Doktorantka stawia jasno sprecyzowany oraz ambitny cel pracy, polegający na poznaniu odpowiedzi na wyciszenie mitochondrialnego rybosomalnego białka S10 na poziomie mitochondriów oraz ekspresji genów jądrowych.

Materiały i Metody stanowią wyczerpującą listę używanych odczynników oraz technik. Zwraca uwagę rzetelne przedstawienie procedur eksperymentalnych. Doktorantka zastosowała bogatą gamę procedur, od hodowli i genetyki roślin po zróżnicowane techniki biochemiczne i biologii molekularnej, obejmujące pracę z RNA, białkami i mitochondriami. Ten bogaty zestaw podejść eksperymentalnych przekłada się na bogactwo wyników zaprezentowanych w pracy.

Wyniki przedstawione w pracy dobitnie wskazują, że Doktorantka wykonała imponującą pracę zakończoną pełnym sukcesem. Zastosowane różnorodne podejścia eksperymentalne doprowadziły do pełnego i bardzo ciekawego obrazu tego, co dzieje się w mitochondriach po wyciszeniu jednego z genów kodujących białko rybosomu mitochondrialnego, Rps10. Wstępne wyniki wyciszenia *rps10* zostały już wcześniej opublikowane przez grupę kierowaną przez p. prof. Jańską. Ta praca postawiła sobie za cel dogłębne zbadanie zmian, jakie zachodzą w mitochondriach wskutek wyciszenia Rps10. Rośliny z wyciszonym Rps10 charakteryzują się dwoma klasami fenotypów. Badania opisane w tej pracy przeprowadzane były na roślinach typu dzikiego oraz na dwóch klasach fenotypowych, nazwanych P2 i P3. Doktorantka przeprowadziła obszerną i solidną charakterystykę biochemiczną i molekularną mutantów, badając obecność białek i RNA dla rybosomów mitochondrialnych, obecność białek oraz RNA dla białek łańcucha oddechowego, pomiary ilości mitochondriów, pomiary wydajności translacji

mitochondrialnej, w tym również proporcje RNA związanych do rybosomów (ulegających translacji). Oprócz tego został zmierzony poziom ekspresji białek będących wskaźnikiem stresu mitochondrialnego (tzw. *mitochondrial dysfunction regulon*) oraz poziom ekspresji proteaz mitochondrialnych.

Pierwszym zaskakującym wynikiem było stwierdzenie, że rRNA kodowane mitochondrialnie wcale nie jest obniżone, ale raczej znacznie podwyższone w mitochondriach po wyciszeniu *rps10*. Dalsza analiza pokazała, że pomimo niezmienionej ilości mitochondriów barwionych fluorescencyjnym barwnikiem MitoTracker Green, ilość mitochondrialnego DNA (mtDNA) jest znacznie podwyższona. Do tej konkluzji Doktorantka doszła dokonując ilościowych pomiarów licznych fragmentów DNA, odpowiadających genom zlokalizowanych w mtDNA. Zgodnie z tymi wynikami, nie tylko poziomy rRNA, ale również poziomy mRNA, dla białek kodowanych mitochondrialnie były podwyższone. Nie zaobserwowano podobnego zjawiska dla jądrowych mRNA kodujących wybrane białka mitochondrialne. Analiza poziomu białek kodowanych mitochondrialnie pokazała, że mimo podwyższonych ilości mRNA, translacja i poziom podjednostek łańcucha oddechowego są jednak obniżone w odpowiedzi na wyciszenie *rps10*, natomiast synteza i poziom białek rybosomalnych były podwyższone. Zaskakujący wynik uzyskano dla białka Rps10, którego wyciszenie widoczne na poziomie mRNA nie prowadziło jednak do obniżenia ilości białka. Tutaj nasuwa się kilka pytań. Czy specyficzność przeciwciała na Rps10 była weryfikowane teoretycznie (obecność sekwencji peptydu użytego jako antygen w innych białkach *Arabidopsis*) lub eksperymentalnie? Czy mitochondria wyizolowane z roślin na wcześniejszym etapie wzrostu charakteryzują się obniżonym poziomem Rps10? Informacje te mogą mieć duże znaczenie dla przyszłego planowania eksperymentów w celu lepszego poznania sygnału inicjującego pętle regulujące odpowiedź mitochondrialną i komórkową (obniżenie mRNA czy obniżenie białka?). Niemniej jednak, niezależnie od intrygującej sprawy Rps10, Doktorantka pokazała, że wskutek wyciszenia *rps10* i uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych następuje wzmożona synteza białek rybosomalnych pochodzących z genomu mitochondrialnego (innych niż Rps10), pociągająca za sobą zmianę w aktywności rybosomów. Dodatkowo, Badaczka zaobserwowała aktywację ekspresji genów charakterystycznych dla sytuacji stresu mitochondrialnego oraz proteaz mitochondrialnych zależnych od ATP (LON na poziomie transkrypcyjnym, i FtsH na poziomie białka), dla których postuluje się ważną rolę w regulacji poziomu białek mitochondrialnych.

Szeroka gama eksperymentów, wykonanych przez Doktorantkę, odznacza się bardzo wysoką jakością i zawiera niezbędne kontrole. O ich poziomie świadczy publikacja znacznej części pracy w prestiżowym czasopiśmie naukowym, *The Plant Cell*, której Doktorantka jest pierwszym autorem. Wnioski wysnute na podstawie wyników są rozważne oraz dobrze udokumentowane.

Serdecznie gratuluję Doktorantce wspaniałej pracy. Niemniej jednak z obowiązku recenzenta, chciałabym przekazać pewne drobne punkty krytyczne do dalszej dyskusji. Na

Rysunku 4.3 próbka typu dzikiego nie jest równa 1. Względem czego był szacowany poziom rRNA w tym eksperymencie (i podobnych)? Dla przykładu, w eksperymentach, gdzie oznaczano ilości białek za pomocą przeciwciał, nakładano jasno podane ilości białka. Mam pewne zastrzeżenia co do nomenklatury dotyczącej rybosomów, które chciałabym poddać dyskusji. Na rycinie 4.17 pojedynczy rybosom powiązany z mRNA jest podpisany jako polisom, natomiast rozdysocjowane podjednostki są podpisane jako rybosom.

W pracy zamieszczone są wyniki będące efektem współpracy naukowej. To dowodzi, że Doktorantka potrafi pracować z innymi badaczami, co we współczesnej nauce jest niezbędną umiejętnością. W pracy czytamy, że oznaczenie ploidalnosci (Rys. 4.8) zostało wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej i Cytometrii, kierowanym przez prof. dr hab. Elwirę Sliwińską (Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy), jednak nie jest jasne, kto wykonał eksperyment: sama Doktorantka, czy badacz ze współpracującego laboratorium.

Dyskusja jest obszerna i świadczy o dojrzałości Doktorantki. Najciekawsza wydaje mi się część poświęcona omówieniu wyników w kontekście hipotezy filtrowania rybosomów, która zakłada aktywną rolę rybosomów w modulacji syntezy z poszczególnych mRNA. Jednak i tu pozwolę sobie na drobną krytykę. Ta część zyskałaby, gdyby Doktorantka częściej posiłkowała się literaturą dotyczącą innych niż rośliny organizmów. Dziedzina wiedzy badająca odpowiedzi na stres mitochondrialny ma długą historię, a ostatnie lata przyniosły przełomowe prace. W dyskusji zabrakło próby odniesienia odkryć dokonanych przez Autorkę do zjawisk opisanych w innych organizmach.

Podsumowując, wartość merytoryczną rozprawy, jakość eksperymentów, oryginalność wniosków i znaczenie uzyskanych wyników, a także kompetencje Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Drobne uwagi krytyczne podyktowane są chęcią pobudzenia dyskusji i nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę naukowej wartości pracy.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana ładnym językiem, starannie, przejrzyście oraz w interesujący sposób. Praca jest zasadniczo dobrze zredagowana oraz dopracowana. Graficzne przedstawienie wyników jest czytelne. Jedynie Rysunki 4.14 i 4.15 zyskałyby, gdyby poszczególne słupki były dla pełnej jasności podpisane, jakie transkrypty reprezentują. Podpisy znajdują się w opisie do rysunku, wg standardowych wymagań, jednak powoduje to trudności w odczytywaniu tych wyników. Również Rysunek 4.21 zyskałby na jasności, gdyby główne produkty translacji widoczne na autoradiogramie były podpisane. Doktorantka wykonała cenną pracę identyfikacji produktów mitochondrialnej translacji i warto byłoby ją lepiej utrwalić. W dyskusji brakuje rycin, które obrazują bardzo ciekawe konkluzje płynące z tej pracy. Umiejętność graficznego przedstawiania konkluzji i modeli, opartych na wynikach, jest jednym z ważnych sposobów komunikacji odkryć.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kwaśniak dotyczy tematyki odpowiedzi mitochondriów i całej komórki na wyciszenie genu kodującego białko, będące częścią składową małej podjednostki rybosomu mitochondrialnego. Doktorantka przeprowadziła szereg dobrze zaplanowanych i przemyślanych eksperymentów, które pozwoliły na bogate konkluzje. W swoich badaniach Doktorantka użyła całe spektrum nowoczesnych metod biochemicznych i biologii molekularnej. Praca Doktorantki wiele wnosi do zrozumienia wzajemnych zależności pomiędzy procesami zachodzącymi w mitochondriach i ich zależnością od jądra komórkowego. Na podkreślenie i wyróżnienie zasługuje fakt, że wyniki Doktorantki zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *The Plant Cell*. Doktorantka jest pierwszą autorką tej publikacji. Doktorantka jest również autorką trzech prac przeglądowych, poświęconych tematyce zbliżonej do Rozprawy Doktorskiej: systemom proteolitycznym w mitochondriach roślinnych.

Nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18.03.2011 o stopniach i tytułach naukowych. Dorobek naukowy kandydata w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie pracy i dopuszczenie p. mgr Małgorzaty Kwaśniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z wielką przyjemnością pragnę również zgłosić rozprawę mgr Małgorzaty Kwaśniak do wyróżnienia przez Radę Naukową Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Agnieszka Chacińska

A. Chacińska