



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

Poznań, 16.06.2014

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Elwiry Smakowskiej
pt. „Analiza funkcjonalna mitochondrialnej proteazy AtFtsH4 ze szczególnym
uwzględnieniem badań proteomicznych”**

Praca doktorska mgr Elwiry Smakowskiej stanowi wielopoziomową analizę funkcjonowania mitochondrialnej, zależnej od ATP proteazy z *Arabidopsis* – AtFtsH4. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Hanny Jańskiej z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, a więc w uznanym na świecie ośrodku od lat specjalizującym się w badaniu mitochondrialnych proteaz roślin. Badania prowadzono z użyciem mutantów pozbawionych AtFtsH4, które w warunkach fotoperiodu dnia krótkiego i optymalnej temperatury (SD 22°C) oraz w warunkach fotoperiodu dnia długiego i umiarkowanie podwyższonej temperatury (LD 30°C) wykazywały podobne zmiany morfologiczne (głównie w liściach rozety) i rozwojowe (takie jak zahamowanie rozwoju pędu kwiatostanowego). W pracy warunki te nazwano warunkami indukującymi fenotyp. Badano zmiany wywołane brakiem proteazy AtFtsH4 w proteomie mitochondrialnym, w tym wśród białek utlenionych (w tzw. oksyproteomie mitochondrialnym) oraz na poziomie wybranych transkryptów i metabolitów. Trzeba tu podkreślić, że bardzo rzadko zdarza się by praca doktorska obejmowała aż trzy „omiczne” poziomy badań. W pracy poszukiwano także potencjalnych substratów i fizjologicznych partnerów proteazy AtFtsH4 z wykorzystaniem metod biochemicznych i biologii molekularnej. Ponadto badano profil ekspresji proteazy AtFtsH4 na poziomie aktywności promotora, transkryptu i białka w różnych warunkach wzrostu *Arabidopsis*.

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest dość ładnym i jasnym językiem. Praca jest bardzo obszerna, liczy w sumie 255 stron. Zawiera 72 ryciny oraz 19 tabel. Układ pracy jest następujący: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, 5 załączników, lista stosowanych skrótów i symboli oraz licząca 253 pozycji bibliografia. Lista stosowanych skrótów, która zresztą jest niepełna, powinna być umieszczona na początku pracy. Załączniki, które z kolei powinny być umieszczone na końcu pracy, obejmują opis klonowania promotorów AtFtsH4, otrzymywania roślin transgenicznych z nadekspresją lub z mutacjami w ważnych domenach proteazy, spis stosowanych starterów oraz spis białek zidentyfikowanych poprzez analizę 2D DIGE oraz białek karbonylowanych, których ekspresja istotnie różniła się w mutantach bez proteazy w stosunku do kontroli. W Załączniku 7.5 użyto niewłaściwego pojęcia „białka różnicujące”. Na końcu rozprawy umieszczono listę 3 publikacji, w których mgr Smakowska jest współautorem. Praca jest zbyt obszerna, choć jej objętość tłumaczy złożoność podjętej

analizy funkcjonowania proteazy AtFtsH4 w roślinach *Arabidopsis*, na którą składa się olbrzymia liczba doświadczeń wykonanych różnorodnymi technikami. W pracy znajduje się jednak wiele błędów redakcyjnych czy stylistycznych, których nie omawiam, co świadczy o pośpiechu przy jej powstawaniu. Objętość pracy niepotrzebnie zwiększyła zbyt duże marginesy (dolny i górny) oraz zbyt szczegółowe podanie większości publikacji obejmujące numery identyfikacyjne PubMed i PubMed Central. Ponadto, bibliografia została przedstawiona niejednolicie. Z drugiej strony, niektóre ryciny z wynikami są zbyt małe a przez to słabo czytelne (Rys. 4.14a, 4.17, 4.23a, 4.24, 4.27, 4.35).

Poprzedzający część doświadczalną Wstęp liczący 47 stron stanowi obszerny przegląd najważniejszej literatury opisujący mitochondrialne białka proteolityczne, proteom mitochondriów roślin, powstawanie i rolę reaktywnych form tlenu w komórce roślinnej oraz działanie systemów antyoksydacyjnych. Lektura tego rozdziału przekonuje o dużej wiedzy Autorki i znajomości piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień. We Wstępie znajduje się kilka nieścisłości:

- przypisanie kompleksu V do mitochondrialnego łańcucha oddechowego (s. 23),
- przypisanie białka rozprzegającego do alternatywnego szlaku transportu elektronów (s. 33),
- nieadekwatne nazwanie podrozdziału „Pojęcie stresu oksydacyjnego” zamiast po prostu „Stres oksydacyjny”.

Proszę o wyjaśnienie, które mitochondrialne mechanizmy antyoksydacyjne zaliczymy do pierwszej, a które do drugiej linii obrony.

Rozdział Materiał i metody (38 stron) zawiera opisy stosowanych przez Doktorantkę metod badawczych. Uwagę zwraca różnorodność stosowanych technik, świadcząca o dużej wszechstronności i biegłości w pracy doświadczalnej. Na niezwykle szeroki wachlarz metod i technik badawczych wykorzystanych w pracy składają się m. in.: hodowla roślin na różnych podłożach; izolacja i oczyszczanie mitochondriów; izolowanie oraz ilościowe oznaczanie białek, DNA i RNA; techniki syntezy i sekwencjonowania DNA; przygotowywanie konstruktyw genetycznych (szczegółowo opisane z Załączniku 1 i 2); różnorodne techniki rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych i białek, w tym dwukierunkowa fluorescencyjna elektroforeza różnicowa (2D-DIGE) białek mitochondrialnych, ogniskowanie izoelektryczne, dwukierunkowa elektroforeza w warunkach natywnych (BN-PAGE); identyfikacja białek metodą spektrometrii mas (MALDI-TOF-TOF), białek karbonylowanych za pomocą dwukierunkowego OksyBlotu, identyfikacja białek za pomocą immunodetekcji i wybarwiania; transformacja bakterii i roślin *Arabidopsis*; testy stabilności białek mitochondrialnych; wreszcie analiza metabolomu przy użyciu chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Moim zdaniem, brakuje podrozdziału „Analiza statystyczna” i wyjaśnienia zastosowanego podejścia statystycznego. Nigdzie nie napisano czy wyniki przedstawione w dalszej części pracy w formie słupków są $\pm$ S.D. czy $\pm$ S.E., nie odniesiono się także do istotności statystycznej obserwowanych zmian (*p*).

W najobszerniejszym rozdziale Wyniki, który obejmuje 76 stron (!), Autorka rozprawy przedstawia wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych zestawionych wcześniej w rozdziale Cele pracy. Wyniki zilustrowano 37 rycinami oraz 5 tabelami. Przebrnięcie przez tak dużą ilość informacji stanowi wyzwanie dla czytelnika. Po każdym

podrozdziale Autorka umieszcza krótkie podsumowanie, które porządkuje przedstawione wyniki, co ułatwia lekturę tej części pracy zwłaszcza, że interpretacja zebranych wyników nie jest łatwa. Najbardziej czasochłonną i wymagającą dużego wysiłku od Doktorantki była porównawcza analiza proteomiczna mitochondrialnych białek u mutantów AtFstH4 i roślin kontrolnych. Sama ta część wystarczyłaby na osobną pracę doktorską. Ponadto, połączenie dużej liczby wyników badań morfologiczno-rozwojowych, funkcjonalnych, wyników analizy proteomu mitochondrialnego (70 analizowanych podjednostek białkowych) oraz zmian wybranych transkryptów (ponad 50 transkryptów) i wybranych metabolitów (prawie 50 metabolitów), obserwowanych w mutantach roślin pozbawionych AtFtsH4 w stosunku do roślin kontrolnych, było niezwykle trudne i wymagało dużej wiedzy na temat biologii roślin i funkcjonowania mitochondriów roślinnych. Dla mnie niezwykle ciekawe było bardzo różnorodne podejście eksperymentalne mające na celu wytypowanie potencjalnych substratów badanej proteazy. Należy także podkreślić, że Doktorantka krytycznie, zachowując dużą rozwagę, opisała problemy związane z interpretacją zebranych wyników zarówno w rozdziale Wyniki, jak i dalej w rozdziale Dyskusja. Po Dyskusji umieszczono Podsumowanie, które w zwięzły sposób przypomina i porządkuje najważniejsze wyniki (a jest ich bardzo dużo).

Oto kilka uwag i spostrzeżeń do przedyskutowania:

- (i) W rycinach 4.15 i 4.16 nie wyjaśniono znaczenia zastosowanych kolorów. Część symboli jest niezrozumiała, pojawiają się też nazwy w języku angielskim.
- (ii) Jaką zmianę w poziomie białka przyjęto za istotną podczas porównawczej analizy proteomu mitochondrialnego techniką 2D-DIGE? Czy technika ta ma słabe punkty?
- (iii) W punkcie 4.4.2 brakuje ilościowej analizy poziomu białek i aktywności kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej.
- (iv) Podczas porównywania poziomu białek metodą immunodetekcji nie odnoszono się do poziomu białka referencyjnego (kontroli nałożenia prób) (Rys. 4.18, 4.34).
- (v) Rysunek 4.21 powinien być uzupełniony o zdjęcie rozdziału elektroforetycznego karbonylowanych białek mitochondrialnych.
- (vi) Przedstawiając zmiany w poziomie wybranych metabolitów (Rys. 4.26) nie uwzględniono odchyłeń czy błędów ($\pm$ S.D. lub $\pm$ S.E).

Rozdział Dyskusja (liczący 12 stron) w zasadzie wyczerpuje problemy wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych autorów. Podobnie jak całość pracy, czyta się ten rozdział dobrze. Bardzo solidne przedyskutowanie otrzymanych wyników przez Doktorantkę świadczy o jej dużej wiedzy. Doktorantka potrafiła krytycznie przedyskutować uzyskane wyniki (co jeszcze raz powtórzę nie było proste) i wyciągnąć Wnioski, z których najważniejsze zostały trafnie zestawione na końcu pracy. Wyniki doświadczeń przedstawione w rozprawie nie tylko stanowią dobrą podstawę do dalszych badań, ale same powinny być wkrótce opublikowane w bardzo dobrych czasopismach. Badania przedstawione przez mgr Smakowską stanowią duży krok do poznania funkcjonowania zależnej od ATP mitochondrialnej proteazy AtFstH4 *Arabidopsis*, tym samym do zrozumienia ilościowej i jakościowej kontroli białek mitochondrialnych w roślinach. Wobec złożonego układu doświadczalnego, olbrzymiej liczby uzyskanych wyników wyciągnięcie prawidłowych wniosków z przedstawionych badań jest trudne. Mimo to Autorka dobrze poradziła sobie z analizą uzyskanych danych.

Na koniec proszę jeszcze o przedyskutowanie nurtującego mnie zagadnienia. Badania wskazują, że substratem dla proteazy AtFstH4 może być inna proteaza mitochondrialna typu m-AAA, AtFtsH10. Domeny katalityczne proteazy AtFstH4 skierowane są do przestrzeni międzybłonowej a potencjalny substrat (AtFstH10) jest białkiem o odwrotnej orientacji względem wewnętrznej błony mitochondrialnej, stąd niewielka jego część jest ekspozycja do przestrzeni międzybłonowej. Czy można to pogodzić/wytłumaczyć? Czy w mutantach pozbawionych AtFtsH10 obniżony jest poziom AtFtsH4?

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej pracy. Wysoko oceniam wartość i znaczenie badań przeprowadzonych przez mgr Elwirę Smakowską, które wyraźnie wskazują, że mitochondrialna proteaza AtFstH4 wpływa na utrzymanie prawidłowej homeostazy mitochondriów, a jej brak pogłębia stres oksydacyjny i zaburza wiele procesów ważnych dla prawidłowego funkcjonowania roślin. Niezwykle ważne są także badania dotyczące ustalenia substratów badanej proteazy. Jestem pewna, że wyniki tych badań wzbudzą duże zainteresowanie w gronie specjalistów. Podsumowując, na podkreślenie zasługują: (i) merytoryczna wartość pracy związana z wielopoziomą analizą funkcjonalną AtFtsH4, łączącą bardzo różne metody badawcze, badania zmian morfologiczno-rozwojowych, podejście proteomiczne, transkryptomiczne i metaboliczne, badania biochemiczne i biologii molekularnej, (ii) olbrzymia pracowitość doświadczeń i analiz, a także (iii) umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników przez Autorkę. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wniosuję zatem o dopuszczenie mgr Elwiry Smakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie recenzowanej rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz