



dr hab. Magdalena Wołoszyńska, prof. uczelni
Katedra Genetyki
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Kozuchowska 7
51-631 Wrocław

Wrocław, 27 września 2023 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Małas „Molekularna charakterystyka roślinnych mitoferryn” wykonanej w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kabały, prof. UWr.

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań

Przedstawiona do recenzji praca doktorska prezentuje całkowicie nowe wyniki badań poświęconych roślinnym mitoferrynom - słabo poznanym transporterom żelaza biorącym udział w wewnątrzkomórkowym transporcie tego mikroelementu. Analizowane w pracy mitoferryny uczestniczą w transporcie żelaza do mitochondriów (dwie z nich - MIT1 i MIT2) i do chloroplastów (trzecia - MFL1). Utrzymanie stężeń żelaza w bardzo wąskim spektrum prawidłowych wartości musi stanowić wyzwanie dla wewnątrzkomórkowego transportu jonów, a w szczególności w mitochondriach i chloroplastach, ponieważ to te kompartmenty są miejscami oddychania i fotosyntezy – procesów zależnych od udziału żelaza. W kontekście biologii molekularnej, biochemii i fizjologii komórki roślinnej zrozumienie funkcjonowania mitoferryn jest bardzo istotne. Wyjątkowo ważne i interesujące jest odkrycie mechanizmów regulowania ich aktywności w odpowiedzi na zmiany w dostępie do środowiskowych zasobów żelaza. W szerszym kontekście badania te mają ogromne znaczenie teraz, kiedy szybko postępujące zmiany klimatyczne wpływają na warunki wzrostu tradycyjnie uprawianych roślin, w tym również na pobieranie żelaza z gleby. Z drugiej strony, rośliny są podstawą diety dla wielu mieszkańców Ziemi i jednocześnie są dla nich głównym, a nawet jedynym, źródłem żelaza. W tej sytuacji należy docenić, że w recenzowanej pracy analizowane są nie tylko mitoferryny *Arabidopsis thaliana* – rośliny modelowej, ale również mitoferryny ogórka, a więc rośliny użytkowej.

b. Wartość naukowa rozdziałów

Jak już napisałam, prezentowane wyniki są oryginalne i ważne dla postępu badań podstawowych oraz potencjalnych aplikacji w uprawie roślin. Dodatkowo o wysokiej wartości pracy stanowi równoległe wykonanie prac eksperymentalnych i analiz *in silico* dla dwóch gatunków roślin. Wybór modelowego organizmu *Arabidopsis thaliana* pozwolił doktorantce korzystać z narzędzi takich jak liczne mutanty, bazy danych, zoptymalizowane protokoły transformacji i selekcji roślin. Włączenie do prowadzonych prac gatunku uprawnego jakim jest ogórek, z jednej strony podniosło rangę uzyskanych wyników, ale z

drugiej strony niewątpliwie skomplikowało wykonanie eksperymentów oraz interpretację rezultatów. Udokumentowane w rozprawie różnice między wynikami uzyskanymi dla rzodkiewnika i ogórka, chociażby te dotyczące ekspresji genów kodujących mitoferry, są tylko jednym z wielu przykładów pokazujących jak trudne jest w biologii roślin wyciąganie ogólnych i kategorycznych wniosków, które sprawdziłyby się poza konkretnym, szczególnym układem badawczym. Uważam jednak, że podjęcie tego zadania stanowi jedną z największych naukowych wartości tej pracy i jest kolejnym dowodem na to jak potrzebne są badania translacyjne dotyczące roślin. Za najbardziej wymagające, a zarazem najciekawsze i najlepiej udokumentowane uważam prace nad lokalizacją subkomórkową mitoferry w protoplastach rzodkiewnika i w komórkach drożdży, wyniki komplementacji drożdżowego mutantu przez mitoferry roślinne oraz identyfikację reszt aminokwasowych mitoferry kluczowych dla ich funkcji biologicznej.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Wstęp prezentuje stan wiedzy na temat znaczenia żelaza dla metabolizmu roślin, mechanizmów jego pobierania przez rośliny, dalekiego i wewnątrzkomórkowego transportu, homeostazy, czynników odpowiedzialnych za jej regulację i transporterów MCF, a w szczególności mitoferry. To teoretyczne wprowadzenie jest bardzo obszerne i gruntowne, ma logiczną kompozycję prowadząc czytelnika od zagadnień ogólnych do najbliższych tematowi rozprawy. Myślę jednak, że znaczne skrócenie tych części wstępu, które nie dotyczą transportu wewnątrzkomórkowego żelaza poprawiłoby przejrzystość pracy i pozwoliło skupić uwagę czytelnika na mitoferry budując u niego większe napięcie i zaciekawienie wynikami pracy. Ostatecznie to właśnie taką strategię przyjęła doktorantka pisząc krótki rozdział Cel pracy, który jest bardzo dobrze skonstruowany – wskazuje na lukę w wiedzy o wewnątrzkomórkowym transporcie żelaza, w jasny sposób identyfikuje białka MIT i MFL oraz ich geny jako najbardziej oczywiste obiekty badań, podkreśla trafność wybranego układu badawczego i precyzuje poszczególne cele badań określając jednocześnie kolejne etapy planowanych prac. Wykorzystane w pracy narzędzia bioinformatyczne i statystyczne oraz metody eksperymentalne są na ogół opisane szczegółowo i precyzyjnie. Niektóre procedury przedstawiono z dokładnością protokołów laboratoryjnych. Za bardzo cenne uważam umieszczenie w rozdziale Materiały i metody precyzyjnego opisu warunków kiełkowania i wzrostu roślin z uwzględnieniem wszystkich wariantów upraw w zależności od celu ich prowadzenia. Ilustrujące ten rozdział schematy eksperymentów oraz tabele zawierające szczegóły na temat szczepów bakteryjnych i drożdżowych, starterów i wektorów stanowią znakomitą dokumentację i ułatwiają zrozumienie wykonanych prac. Mój podziw wzbudza różnorodność układów badawczych, metod i procedur, które doktorantka poznała, aby przygotować tę pracę. Już samo wykonanie wielu eksperymentów dla dwóch gatunków roślin musiało być pracochłonne. Dodatkowo, klonowanie genów wymagało opanowania niektórych metod mikrobiologicznych, prace nad lokalizacją mitoferry oznaczały nabycie umiejętności izolacji i transformacji protoplastów *Arabidopsis thaliana*, a osobną, dużą część badań przeprowadzono w komórkach drożdżowych, co wiązało się z koniecznością poznania procedur ich hodowli, transformacji i analizy. Uprawa roślin w różnych warunkach, hodowla bakterii i drożdży, transformacja tych organizmów, izolacja i analiza kwasów nukleinowych oraz białek, metody wizualizacji organelli i znakowanych białek oraz metody oznaczania stężenia żelaza w różnych przedziałach komórkowych składają się na imponujący warsztat młodej naukowiec.

Wyniki są przedstawione i interpretowane w bardzo klarowny i przekonujący sposób, opis eksperymentów rozpoczyna się od wskazania ich celu i planu postępowania, a uzyskane rezultaty są najczęściej ilustrowane czytelnymi wykresami lub zdjęciami. Doktorantka potwierdza w przypadku *A. thaliana* i identyfikuje w przypadku ogórka sekwencje genów trzech mitoferry, potwierdza ich przynależność do rodziny MCF na drodze analizy *in silico*, ustala lokalizację MIT1 i 2 w mitochondriach a MFL1 w chloroplastach, ustala specyficzność i powinowactwo mitoferry wobec żelaza i ustala tożsamość reszt aminokwasowych niezbędnych dla transportu żelaza lub z dużym

prawdopodobieństwem uczestniczących w tym procesie. Myślę, że Doktorantka mogłaby osiągnąć jeszcze lepszy efekt, gdyby wyniki poszczególnych eksperymentów były prezentowane łącznie dla rzodkiewnika i ogórka w tych samych podrozdziałach pracy. Ułatwiłoby to dostrzeganie różnic i podobieństw i wzmocniło najważniejsze konkluzje rozprawy.

Analiza ekspresji genów mitoferryn, rozumiana jako stabilny poziom transkryptów w różnych organach roślin rzodkiewnika lub ogórka i w odpowiedzi na niedobór lub nadmiar żelaza, nie przynosi pewnej odpowiedzi na pytanie, czy zmiany w liczbie kopii mRNA poszczególnych genów mitoferryn mogą być regulowane w zależności od organu rośliny lub dostępności żelaza. To niewątpliwie mniej satysfakcjonująca część wyników, ale podobnie jak w przypadku najbardziej jednoznacznych danych, doktorantka bardzo umiejętnie i z dużą dojrzałością komentuje tę sytuację interpretując swoje rezultaty i porównując je do opublikowanych wyników uzyskanych przez innych autorów. Chciałabym przedstawić swój komentarz tej części pracy poniżej w Uwagach krytycznych z nadzieją, że moje wątpliwości i pytania przyczynią się do optymalizacji tej części eksperymentów.

Moją uwagę w Dyskusji zwróciły rozważania Doktorantki wskazujące na konieczność uwzględnienia i rozróżnienia istotności statystycznej i biologicznej podczas oceny znaczenia uzyskanych wyników. Uważam tę refleksję za bardzo ważną, ponieważ coraz bardziej oczywiste staje się, że jednym z największych problemów współczesnej nauki jest brak powtarzalności publikowanych badań, który nie bierze się ze świadomego sprzeniewierzenia się uczciwym praktykom badawczym ale raczej z jakiejś immanentnej wady naszego warsztatu, którą może być zbyt łatwe uznawanie wyników za istotne.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca ma klasyczny układ typowy i odpowiedni dla prezentacji wyników badań prowadzonych w naukach biologicznych. Doktorantka włączyła również do pracy bardzo pomocny Wykaz skrótów. Praca napisana jest bardzo dobrą poprawną polszczyzną, która jednocześnie w wykonaniu Doktorantki stała się precyzyjnym językiem naukowym. Ten aspekt pracy należy wyjątkowo docenić, ponieważ nie jest to łatwa do osiągnięcia kombinacja. W uwagach krytycznych zamieściłam kilka sugestii, które mogą pomóc Doktorantce w dalszym ulepszeniu stylu pisania prac naukowych. Szata graficzna pracy znajduje moje uznanie, poprzez swoją oszczędność jest odpowiednia dla prezentowanych wyników, sprawia, że ich zrozumienie jest łatwiejsze i nie rozprasza niepotrzebnymi szczegółami.

4. Uwagi krytyczne

a. Uwagi i pytania merytoryczne

- Mam kilka pytań i sugestii dotyczących koncepcji eksperymentów, których celem była analiza ekspresji genów kodujących mitoferryny: (1) Na jakiej podstawie dokonano wyboru genów referencyjnych? Wiem, że kierowano się literaturą, ale czy wykonano analizę stabilności genów referencyjnych dla reprezentatywnej grupy próbek cDNA ogórka i rzodkiewnika pochodzących z tkanek/organów i warunków wzrostu o różnej dostępności żelaza - takich, jak te wykorzystywane później w eksperymentach? (2) Czy sprawdzono wydajność reakcji dla wszystkich starterów? Wyniki PCR w czasie rzeczywistym są wiarygodne (ilościowe) tylko przy wysokich wartościach wydajności reakcji. (3) Jak wykonywano krzywą topnienia produktów uzyskiwanych w reakcjach qPCR? W programie PCR przedstawionym w Tabeli 6 znajduje się pozycja topnienie z temperaturą 65-68°C w zależności od temperatury przyłączania starterów. Jaki jest cel tego etapu? Wykonanie krzywej topnienia wymaga bardziej złożonego programu, który rozpoczyna się po ostatnim cyklu PCR i w którym próbki są denaturowane w temperaturze 95°C, następnie schładzane do około 65°C i podgrzewane powoli z ciągłym pomiarem sygnału fluorescencyjnego do temperatury 97°C.

- Na str. 86 w podrozdziale 3.4.3 znalazłam informację dotyczącą jakości preparatów kwasów nukleinowych, z której wynika, że za satysfakcjonujące uznawano preparaty o wartości 1,5 parametru

obliczanego jako proporcja absorpcji mierzonych przy falach o długości 260 i 230 nm. To niska wartość, prawdopodobnie spowodowana obecnością zanieczyszczeń w preparatach kwasów nukleinowych, które silnie absorbują fale o długości 230 nm. Takie związki często działają denaturująco wobec białek, co może zaburzać reakcje enzymatyczne, np. reakcję odwrotnej transkrypcji.

- Na str. 91 w podrozdziale 3.7.3 opisane są warunki reakcji trawienia enzymatycznego wektorów lub produktów PCR, które poprzedzały reakcję ligacji. Moją uwagę zwrócił bardzo długi czas przez jaki DNA poddawano działaniu enzymów restrykcyjnych (przez noc) i duże stężenia enzymów (nawet 40 U w przypadku enzymu *XbaI*). Bardziej efektywne byłoby rozdzielanie dodawanego enzymu na mniejsze porcje i dodawanie go w odstępach godziny lub dwóch.

- Moje kolejne pytanie odnosi się do informacji na temat metody selekcji linii homozygotycznych pokolenia T3 opisanej w podrozdziale 3.12.2.3 na stronie 102: Czy homozygotyczność tych roślin potwierdzano również za pomocą PCR?

- Na str. 107 na rycinie 21 znajduje się porównanie sekwencji genu *CsMIT1* wygenerowanej *in silico* oraz sekwencji produktów PCR uzyskanych na matrycy cDNA otrzymanych po odwrotnej transkrypcji preparatów RNA pochodzących z korzeni, liścieni i liści. Po analizie tych sekwencji i porównaniu ich ze starterami, których użyto do amplifikacji, doszłam do wniosku, że sekwencje zaznaczone na rycinie kolorami pomarańczowym i żółtym nie należą do cDNA ale częściowo do wektora i częściowo do starterów. Prawdopodobnie taka sytuacja ma również miejsce na rycinach 22 i 23 w odniesieniu do genów *CsMIT2* i *CsMFL1*.

- Na stronie 120 w podrozdziale 4.4.2 opisane jest wyznaczenie sekwencji kierujących do chloroplastów dla białek AtMFL1 (sekwencja wyznaczona przez program ChloroP) i CsMFL1 – sekwencja „wyznaczona samodzielnie”, chciałabym zapytać jakie były kryteria wyboru aminokwasów należących do tej sekwencji.

- Porównując wykresy przedstawione na rycinach 52 i 53 zauważyłam dwukrotną różnicę w poziomie żelaza w mitochondriach szczepu typu dzikiego, również szczep Δ mrs3 Δ mrs4 wykazywał taką różnicę między eksperymentem zilustrowanym na dwóch rycinach. Czym można usprawiedliwić takie różnice między eksperymentami i czy były one często obserwowane? Zadam pytanie, ponieważ różnice między szczepem typu dzikiego a szczepem mutanta są tego samego rzędu.

- Dlaczego, zdaniem Doktorantki, poziom żelaza w cytoplazmie szczepów Δ mrs3 Δ mrs4+MIT1 i Δ mrs3 Δ mrs4+MIT2 jest istotnie wyższy niż w przypadku szczepu typu dzikiego chociaż stężenie żelaza w mitochondriach tych trzech szczepów nie jest różne (str. 138, ryc. 54)? Podobnie jest w przypadku szczepu Δ mrs3 Δ mrs4 + CsMIT2 (str.140, ryc. 55).

- Na ryc. 56a (str.142) przedstawione jest porównanie sekwencji aminokwasowych MIT1 i MIT2 pochodzących z różnych organizmów. Na porównaniu tym widocznych jest wiele dobrze zakonserwowanych reszt aminokwasowych, co może sugerować ich istotne znaczenie dla funkcji mitoferrynu, a jednak reszty te nie zostały wybrane do mutagenyzy. Jakie były zatem kryteria tego wyboru?

- W Dyskusji na str. 172 Doktorantka pisze: „Szczep ten (czyli Δ mrs3 Δ mrs4) charakteryzuje się obniżonym poziomem Fe w obu kompartmentach (czyli mitochondriach i cytoplazmie).” Tymczasem na rycinach 54 i 55 widoczny jest podwyższony poziom żelaza w cytoplazmie tego szczepu. Czy podczas obrony Doktorantka mogłaby wyjaśnić tę nieścisłość?

b. Uwagi formalne

- str. 13: „Mutacje reszt ... w AtMIT2 również prawdopodobnie uczestniczą w przenoszeniu żelaza...”, to nie mutacje uczestniczą, ale same reszty aminokwasowe.

- str. 17: „... zaburzenia homeostazy innych metali korzystnych...”, sformułowanie „metale korzystne” jest raczej nieścisłe.

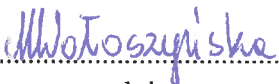
- str. 24: „Do jego ekspresji dochodzi w błonie zewnętrznej komórek epidermalnych korzenia ...” - do ekspresji dochodzi w komórkach, a później białko jest wbudowywane w błonę.
- str. 34: „... poprawne funkcjonowanie (fotosyntezy) wymaga aż 22 jonów żelaza.” Należałoby wyjaśnić jak wykonano te obliczenia.
- str. 58: „... powstanie pierwszego białka-przodka obecnych transporterów MCF mogło napędzać, lub przynajmniej wspomagać, genezę mitochondriów.” „Napędzanie” genezy to niefortunne sformułowanie.
- str. 68 i inne: „ekspresja organowa” – raczej ekspresja specyficzna dla organu lub organospecyficzna.
- str. 73: „Geny kodujące mitoferryiny u ogórka zostały zidentyfikowane na podstawie analizy *in silico*, posługując się dostępną sekwencją genomu ...” Raczej: ... na podstawie analizy *in silico*, podczas której posłużono się ...
- str. 100: „Liczbę protoplastów zliczano z powierzchni 1 mm³.” Zapewne chodziło o 1 mm².
- str. 104 i inne: „numery akcesji”, raczej numery dostępu.

5. Ocena końcowa

Moim zdaniem praca doktorska pani magister Karoliny Małas przedstawia spójny cykl bardzo dobrze zaplanowanych i przemyślanych eksperymentów, których wyniki przekonująco charakteryzują geny i kodowane przez nie roślinne mitoferryiny określając ich wzór ekspresji, lokalizację i istotne aspekty pełnionych funkcji. Ranga tych badań została również doceniona przez ekspertów Narodowego Centrum Nauki, które przyznało Doktorantce grant Preludium 15. Informację o tym fakcie udało mi się odkryć na ostatniej stronie pracy doktorskiej, co uważam za niezwykle dowód skromności. Biorąc pod uwagę warsztat badawczy, który autorka zbudowała realizując tę pracę, umiejętność krytycznej interpretacji wyników i ich dyskusję w kontekście stanu wiedzy opisanego w literaturze, uważam, że pani mgr Karolina Małas jest dojrzałym naukowcem gotowym do przyjęcia stopnia naukowego doktora. Dlatego, ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Małas spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Karoliny Małas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Karoliny Małas, ponieważ doceniam wartość naukową tej pracy, odwagę autorki, która podjęła tak liczne wyzwania badawcze, a ich realizację i uzyskane wyniki opisała rzetelnie i krytycznie.

27 września 2023 roku
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta