

Recenzja pracy doktorskiej Mgr Natalii Sawki

pt. „Molekularne mechanizmy determinacji typów płciowych u wybranych gatunków zespołu *Paramecium aurelia*”

Praca doktorska Mgr Natalii Sawki wykonana została pod kierunkiem Dr hab. Małgorzaty Prajer i promotora pomocniczego Dr hab. Sebastiana Tarcza w Zakładzie Zoologii Doświadczalnej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w ramach Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk.

Obiektem badań doktorantki jest *Paramecium aurelia* – jednokomórkowy model Eukaryota, który pojawił się w ewolucji około 1.5 mld lat temu i został opisany już w roku 1773. Dopiero ponad 200 lat później okazało się, że to zespół 15 gatunków bliźniaczych. I nie jest tak, jak napisała doktorantka, że ‘morfologicznie nieodróżnialnych od siebie’ – bo przecież różnią się np. znacznie wielkością - jak sama to cytuje. Nauka światowa ‘zawdzięcza’ tej komórce epokowe odkrycia takie jak: uniwersalny schemat budowy rzęsek, pierwsze białko motoryczne – dyneina, rybozomy czy obecność kanałów jonowych (poza neuronami i mięśniami). W 2006 roku okazało się, że w toku ewolucji nastąpiła trzykrotna duplikacja całego genomu *Paramecium* – prawdopodobna przyczyna powstania gatunków bliźniaczych.

Paramecium charakteryzuje się – tak jak inne orzęski – występowaniem dwóch rodzajów jąder funkcjonujących w cytoplazmie w obrębie tej pojedynczej komórki.

Poliploidalne makrojądro kontroluje funkcje somatyczne, a diploidalne mikrojądra – w różnej liczbie zależnie od gatunku – odpowiedzialne są za procesy płciowe i są aktywne w trakcie konjugacji lub autogamii.

Cel badań doktorantki to poznanie mechanizmów determinacji typów płciowych u dwóch gatunków zespołu *Paramecium aurelia* reprezentujących dwa różne sposoby ich dziedziczenia: *P. biaurelia* – sposób klonalny (dziedziczenie cytoplazmatyczne, matczyne) i *P. tredecaurelia* - dziedziczenie mendlowskie.

Inspiracją do badań były wyniki opublikowane rok temu w *Nature* przez zespół 20 autorów, wśród których jest promotor niniejszej rozprawy i Prof. dr hab. E.Przyboś. Dotyczyły one komórek *P. tetraurelia*, *P. octaurelia* i *P. septaurelia*, w których zidentyfikowano 3 geny zaangażowane w proces determinacji typów płciowych: *mtA*, *mtB*, *mtC*. W komórkach *P. tetraurelia* typ płciowy E kodowany był przez białko transbłonowe *mtA* odpowiedzialne za aglutynację z komórkami typu płciowego O, a typ O kodowany przez *mtA* po wycięciu promotora tegoż genu wraz z sekwencją IES (tak, jak u *P. octaurelia*). Natomiast w komórkach *P. septaurelia* typ O jest uwarunkowany delecjami w genie *mtB* i nie ma ekspresji *mtA*, bo *mtB* i *mtC* kodują czynniki transkrypcyjne konieczne do jego aktywacji.

Rozprawa Mgr Natalii Sawki to obszerne opracowanie obejmujące w sumie 151 stron maszynopisu, 35 rycin i 7 tzw. suplementów zawierających m.in. porównanie sekwencji badanych genów.

'Wstęp' obejmuje 21 stron, w którym doktorantka opisuje stan wiedzy na temat m.in. faz cyklu życiowego *Paramecium*, dymorfizmu jądrowego, organizacja genomu

makrojądrowego, procesów płciowych oraz dziedziczenia i determinacji typów płciowych. Są tu potknięcia stylistyczne – jak np. na stronie 16:

‘Granice tychże sekwencji, 5'-TA-3', na obu końcach są konserwatywnie zachowane u wszystkich poznanych sekwencji IES, z czego jedna sekwencja dinukleotydowa TA pozostaje zachowana w chromosomie makrojądrowym po wycięciu sekwencji IES’

W rozdziale ‘Materiał i Metody’ liczącym 24 strony zauważalne są uchybienia stylistyczne i merytoryczne. Za niepoprawny należy uznać następujący opis:

‘przygotowywano kontrolę wszystkich krzyżowanych klonów, zarówno testerów jak i badanych klonów, którą stanowiła podwójna objętość komórek jednego typu płciowego’. Zapewne chodzi tu o podwójną objętość hodowli komórek jednego typu płciowego’. Zastrzeżenia stylistyczne budzi też ten opis: ‘Komórki *P. biaurelia* oraz *P. tredecaurelia* hodowane były na pożywce z sałaty przygotowywanej zgodnie z metodą Sonneborna (1970), dzień przed zastosowaniem inokulowanej bakteriami *Klebsiella pneumoniae* i inkubowanej w temperaturze 37°C. Na str.42 pojawia się dwukrotnie ‘inserir’ zamiast insertu, na kolejnej: stosowano ‘5µl buforu ligacyjnego o koncentracji 2x’.

Niejasny jest opis: ‘Pozostałe startery zaprojektowano na podstawie fragmentów DNA już zsekwencjonowanych przy użyciu starterów dla *P. tetraurelia* lub *P. septaurelia*’. Tu należałoby podać numeru sekwencji z GenBank, jeśli pochodziła z tego źródła, gdyż genom *P. tetraurelia* został zsekwencjonowany w roku 2006 i teraz praca jest łatwiejsza niż niżej podpisanej, gdy uczestniczyła w klonowaniu 3-ciego z kolei zidentyfikowanego genu *Paramecium tetrauralia* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9832-9836) i klonowała kolejne geny *P. octaurealia* ze swoim zespołem.

Na Ryc. 4 (str. 8) pojawia się opis ‘barwienie: laktoorceina’ – ten termin pochodzi z języka angielskiego pisany tam jako: ‘lacto-orcein’ (Westendorf et al. 1989, J. Cell Biol. 108: 1431-1444) i po polsku powinien być zapisany raczej jako ‘laktoorceina’.

‘Wyniki’ obejmują 38 stron i przedstawiają rezultaty doświadczeń uzyskane z użyciem metod/technik takich jak: krzyżówki genetyczne i testy typów płciowych, izolacja DNA i RNA, PCR, sekwencjonowanie, konstruowanie plazmidów, wyciszanie genów metodą ‘feeding’ i komplementacja funkcji genów metodą mikroiniekcji plazmidowego DNA.

Najślabszym wynikiem prezentowanym w rozprawie jest hybrydyzacja Northern: nie ma uwidocznionej żadnej kontrolnej próby np. 16S RNA, co jest przykładowym standardem (PLoS One. 2015 May 7;10(5):e0126325. Ponadto Ryc. 21 *Wynik badania ekspresji genu mtA w reaktywnych kulturach szczepów 209 321(E) P. tredecaurelia* jest tą samą ilustracją nieco tylko pomniejszoną, co Ryc. 16 - *Wyniki badania ekspresji genu mtA w reaktywnych komórkach typu 2A i 2B P. biaurelia*.

Z kolei z opisu na str. 38 wynika, że izolację RNA wykonywano z komórek, których po odwirowaniu z pożywki nie przepłukano żadnym buforem (a to hodowla z użyciem bakterii jako ‘pokarmu’ dla orzęsków). Uzyskany preparat RNA powinien być trawiony DNA-azą (bez aktywności RNA-azy), by pozbyć się nawet śladowych ilości DNA, tym bardziej, że jak wynika z publikacji Arnaiz wsp. z roku 2012 (Genet. 8 (10):e1002984) w genomie *Paramecium tetraurelia* wykryto jeszcze intragenowe sekwencje pochodzenia pasożytniczego.

Należałoby też zarekomendować stosowanie nieradioaktywnych sond z użyciem digoksygeniny – bardzo czułych i używanych w badaniach różnych typów

komórek [Genome (2004) 47:1114-1121], w tym także przez nas na *Paramecium* [Acta Biochim. Pol. (1999) 46:813-821; Eur. J. Cell Biol (2011) 90: 844-853]. Opisałiśmy zalety tej metodyki ['Postępy Biologii Komórki' 25, 125-134 i 25, 135-14], która chroni środowisko przed odpadami promieniotwórczymi.

W suplementach na końcu rozprawy znajduje się dalsza część wyników - porównanie sekwencji badanych genów. Stwierdzono m.in., że w komórkach *P. tredecaurelia*:

w genach: *mtA* Typ O (szczep 209) – jest delecja tyminy w promotorze.

mtB Pseudogen w obu typach płciowych.

mtC Typ O (szczep 209) jest transwersja G na C w porównaniu z typem E (szczep 321), zmieniająca charakter kodowanego aminokwasu.

Natomiast w przypadku *P. biaurelia* nie znaleziono różnic w sekwencjach genów *mtA* i *mtC*, a w genie *mtB* Typ O – delecję 168 par zasad.

W Streszczeniu autorka rozprawy wnioskuje m.in., że w komórkach *P. biaurelia* za determinację typów płciowych odpowiada gen *mtB*. U *P. tredecaurelia* ani gen *mtB*, ani *mtC* nie biorą udziału w tym procesie, gdyż w obu typach to pseudogeny. Jednak wprowadzenie funkcjonalnego genu *mtB* powoduje w komórkach 209 zmianę typu płciowego, co wskazuje na obecność innego genu będącego czynnikiem transkrypcyjnym istotnego w tym procesie, który nie jest funkcjonalny w tym szczepie.

Bibliografia obejmuje 114 pozycji literatury i zawiera istotne dane z badanej dziedziny.

Wymienione powyżej - z powinności recenzenta - uwagi krytyczne nie wpływają na merytoryczną ocenę rozprawy. Dotyczy ona ciekawych procesów regulacji epigenetycznej i dostarcza nowych danych w tej dziedzinie. Doktorantka

podjęła się żmudnego zadania analizy wielu sekwencji. Warte podkreślenia jest, że oba analizowane gatunki *Paramecium* były reprezentowane przez kilka szczepów z odległych geograficznie stanowisk. Poszukiwanie mechanizmów determinacji typów płciowych wiąże się z ich istotną rolą w kontroli przejścia pomiędzy haploidalną a diploidalną fazą cyklu życiowego. Ciekawa jest hipoteza wysunięta w tej rozprawie, że 'u gatunków reprezentujących matczyne sposoby dziedziczenia typów płciowych w drodze ewolucji powstało kilka różnych, niezależnych od siebie mechanizmów odpowiedzialnych za ich determinację'.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Mgr Natalii Sawki spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, jak i warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65. poz. 595 z późn.zm) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Mgr Natalii Sawki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 23 maja 2015


Prof. dr hab. Elżbieta Wyroba