

Prof. dr hab.emer. Włodzimierz Korohoda
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 7
E-mail: W.Korohoda@uj.edu.pl

Kraków, 18 maja 2015

Ocena

rozprawy doktorskiej pani Natalii Sawki, zatytułowanej:

„Molekularne mechanizmy determinacji typów płciowych u wybranych gatunków zespołu *Paramecium Aurelia*” wykonanej pod opieką dr hab. Małgorzaty Prajer oraz promotora pomocniczego dr hab. Sebastiana Tarcza, w Zakładzie Zoologii Doświadczalnej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Praca doktorska pani Natalii Sawki związana jest z prowadzonymi od lat w Zakładzie Zoologii Doświadczalnej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie bardzo zaawansowanymi badaniami biologii orzęsków oraz badaniami z zakresu genomiki funkcjonalnej rozwijanymi w pracowni dr E. Meyera w Ecole Normale Supérieure w Paryżu.

Tematem pracy są genetyczne uwarunkowania determinacji typów płciowych u orzęsków z rodzaju *Paramecium*, zespołu *Paramecium aurelia*. W osobnikach pantofelków należących do tego zespołu występują dwa typy płciowe, określane jako „O” i „E”, osobników nie wykazujących różnic morfologicznych, ale odgrywające, jak to wykazał Sonneborn decydującą rolę w procesach płciowych koniugacji osobników o przeciwnych, komplementarnych typach płciowych. Typy płciowe okazały się dziedzicznymi, a zatem uwarunkowanymi genetycznie. Proces koniugacji, parowanie się komplementarnych osobników, zależy natomiast od cech fenotypowych komórek orzęsków. Cechy behawioralne i fenotypowe pantofelków określane są przez specyficzne białka receptorowe błon komórkowych i rzęsek oraz czynniki transkrypcyjne i RNA regulujące ekspresję genów. Celem badań pani Natalii Sawki było określenie zaangażowania genów w procesach determinujących typy płciowe osobników dwu gatunków zespołu *Paramecium aurelia*: *P. biaurelia* i *P. tredecaurelia*.

Tak określony cel pracy zasługuje na podkreślenie i nie budzi zastrzeżeń. Wiąże się on z podstawowym problemem współczesnej biologii molekularnej i komórkowej: jak genotyp komórki eukariotycznej określa fenotypowe i behawioralne cechy komórek, zarówno organizmów jednokomórkowych jak i komórek budujących tkanki i organy zwierząt wielokomórkowych. Wiemy dzisiaj, że np. genom człowieka obejmuje około 28 tysięcy genów. Ta ich niewielka stosunkowo liczba warunkuje syntezę około 200 tysięcy rozmaitych białek i w ostatecznym efekcie miliony cech genotypowych i behawioralnych złożonych organizmów. Podstawowym celem nowoczesnej biologii komórkowej i molekularnej jest wyjaśnienie, jak informacja zawarta w jednej komórce, zygocie, jest później wykorzystywana do wytworzenia różnorodności cech potomnych komórek budujących rozmaite tkanki, organy i osobniki. Poznanie tych procesów jest podobnie trudne jak wyjaśnienie jak ograniczona stosunkowo liczba słów jakiegoś języka okazuje się wystarczająca do tworzenia rozmaitych zdań i dzieł literackich.

Zawężenie zadań badawczych do określenia jak działają geny w determinacji typów płciowych w dwu gatunkach *Paramecium* jest w pełni uzasadnione. Badania ograniczone do analizy procesów zachodzących w obrębie genomu pantofelka jednoznacznie wskazują, jak złożone są to zjawiska i jak trudnym zadaniem będzie wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do zrozumienia współdziałania regulacji genetycznej i epigenetycznej ujawniania się cech fenotypowych i behawioralnych w komórkach eukariotycznych.

Pani Natalia Sawka w swojej pracy doktorskiej skupiła się na badaniu trzech genów determinujących typy płciowe w *P. tetraurelia*: *mtA*, *mtB*, *mtC*. Gen *mtA* koduje białka transbłonowe osobników typu płciowego E (Even) zaangażowane w ich aglutynację z osobnikami typu płciowego O (Odd), zaś geny *mtB* i *mtC* kodują czynniki transkrypcyjne uczestniczące w aktywacji ekspresji genu *mtA*. W swoich badaniach wykorzystwała wiele nowoczesnych metod biologii molekularnej i komórkowej. Opanowała i zastosowała takie metody jak: izolację DNA z kultur *Paramecium*, reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) i amplifikację fragmentów DNA, sekwencjonowanie fragmentów DNA, metody bioinformatyczne wykorzystania programów do porównywania sekwencji i konstrukcji drzew filogenetycznych, metody izolacji RNA, hybrydyzacji Northern, przygotowywania insertów do transformacji komórek, metody elektroporacji bakterii, metody mikroiniekcji z użyciem mikromanipulatora, wyciszania genów metodą Feeding z wykorzystaniem RNA. Na szczególne podkreślenie zasługuje opanowanie przez doktorantkę metod nowoczesnej genetyki molekularnej sekwencjonowania i badania genów, włącznie z analizą ich ekspresji i

wyciszania. Większość tych metod doktorantka poznała przebywając na długoterminowych stażach w pracowni dr E. Meyera w Ecole Normale Supérieure w Paryżu.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań są dobrze udokumentowane i wskazują, że doktorantka zrealizowała zamierzone cele badawcze. Większość badań pani Sawka wykonała na dwu szczepach *Paramecium tredecaurelia* oznaczonych jako 209 i 321, Osobniki szczepu 321 wykazują typ płciowy „E” a szczepu 209 typ „O”, jak to wykazał Sonneborn już w 1974 roku.. Określiła sekwencje trzech genów *mtA*, *mtB* i *mtC* wraz z rejonami flankującymi zaangażowanych w determinację typów płciowych, występujące w tych genach modyfikacje, transwersje i delecje oraz ich dziedziczenie i wpływ na produkty tych genów oraz na determinację typów płciowych. Potwierdziła hipotezę zakładającą, że determinacja typu płciowego E jest zawsze związana z ekspresją genu *mtA* kodującego białko transbłonowe zaangażowane w aglutynację z komórkami typu płciowego „O”. Wykazała, że geny *mtB* i *mtC* nie są konieczne w determinacji typów płciowych i zasugerowała, że na aktywację genu *mtA* ma wpływ inny, nie opisany jeszcze gen kodujący czynnik transkrypcyjny, który w typie „O” nie działa. Na podstawie analizy swoich badań molekularnych i skonstruowanych drzew filogenetycznych doktorantka wysuwa hipotezę, że w zespole gatunków *Paramecium aurelia* doszło do ewolucji kilku wzajemnie niezależnych mechanizmów determinacji typów płciowych.

Wstęp pracy obejmujący 21 stron maszynopisu i dyskusja wyników obejmująca wraz z wnioskami 13 stron maszynopisu zostały opracowane bardzo starannie w oparciu o dobrze dobraną literaturę omawianych zagadnień. Autorka cytuje 47 prac publikowanych po 2005 roku, co wskazuje na aktualność tematyki badań przedstawionych w pracy doktorskiej. Nie pomija jednak klasycznych prac, nawet publikowanych w latach 30 i 50. ubiegłego wieku, gdy zaczynano badać, chociaż nie na poziomie molekularnym, procesy płciowe u orzęsków. Rozdziały te świadczą o dużej kompetencji Autorki w dziedzinie genetyki molekularnej i biologii orzęsków. Również sposób przedstawienia wyników badań nie budzi zastrzeżeń.

Tekst pracy został przez doktorantkę przygotowany stosunkowo starannie. Nie ustrzegła się jednak kilku błędów i niedociągnięć. Wykaz stosowanych w pracy skrótów zamieszczony na stronie 24 jest niepełny. Na str. 7 Autorka używa terminu „egzony” pisząc o „eksonach”. Termin ten został wprowadzony po zastosowaniu enzymów restrykcyjnych do „wycinania” fragmentów DNA i pochodzi od słowa angielskiego „excise” – wycinać. W oryginalnych pracach, gdy go wprowadzano, rysowano nożyczki tnące łańcuch DNA. Autorka wymiennie stosuje pisownię „injekcja” i poprawną „iniekcja”. W pracy


często pisze niewłaściwie „przy pomocy rzeczy”, podczas gdy powinno się pisać „za pomocą” rzeczy, a „przy pomocy” ludzi.

Poważniejszym niedociągnięciem jest zbyt lakoniczny opis stosowanych w badaniach niektórych metod. O ile metody genetyki opisane są jednoznacznie, to opis niektórych innych metod używanych w badaniach jest niewystarczająco dokładny. Pisząc o elektroporacji komórek bakterii podaje nazwę użytego przyrządu, elektroporatora firmy BioRad, USA, nie podając ani amplitudy, ani długości trwania, kształtu i liczby stosowanych impulsów elektrycznych wysokiego napięcia. Powoduje to, że doświadczenia te stają się niepowtarzalne przy użyciu elektroporatorów innych firm. Na rynku obecnie można zakupić rozmaite elektroporatory produkowane przez kilkanaście firm. Z lakonicznego opisu elektroporacji nie wynika, jak pani Sawka wykonała swoje doświadczenia. Nie można ich sprawdzić używając elektroporatorów innych firm. Również mogą być niepowtarzalne wyniki dotyczące mikroiniekcji, gdyż Autorka nie podała ani średnicy użytych mikropipet, ani rodzaju szkła, z którego były one zrobione. Są to bardzo ważne informacje, niezbędne do powtórzenia doświadczeń opisanych w pracy, gdyż np. białka różnie reagują z różnymi rodzajami szkła, a mechaniczne cechy szkła są decydujące, gdy pracuje się z komórkami Protista lub roślinnymi. Zapewne prowadząc swoje doświadczenia doktorantka korzystała z metod już sprawdzonych w pracowni, w której pracowała, i wyniki jej badań są wiarygodne. Jeśli ktoś chciałby jednak powtarzać i sprawdzać te doświadczenia w innej pracowni, bez ważnych informacji o stosowanej metodzie, napotkałby na trudności.

Chciałbym tutaj podkreślić konieczność szczegółowego opisu stosowanych metod. Opis taki jest niezbędny do potwierdzenia badań w innych pracowniach. Jest to szczególnie ważne w badaniach z zakresu biologii komórkowej i molekularnej oraz biotechnologii, gdyż w tych ważnych i szybko rozwijanych dziedzinach nauki wywierane są najsilniejsze naciski na badaczy przez firmy komercyjne, które często polecają błędne metody i testy do badań biologicznych i ukrywają ważne informacje.

Zamieszczone powyżej uwagi nie mają wpływu na bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej pani mgr Natalii Sawki. Jestem przekonany, że jest Ona już teraz bardzo dobrze przygotowana do kontynuowania prac badawczych w zakresie genetyki molekularnej i biologii komórkowej z wykorzystaniem nowoczesnych metod współczesnej nauki. Chciałbym tylko ostrzec przed bezkrytycznym stosowaniem metod badawczych i wykorzystywaniem aparatury opierając się wyłącznie na protokołach procedur zalecanych przez dostawców sprzętu i odczynników.

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska pani mgr **Natalii Sawki**, zatytułowana „**Molekularne mechanizmy determinacji typów płciowych u wybranych gatunków zespołu *Paramecium aurelia***” wykonana pod opieką dr hab. Małgorzaty Prajer oraz promotora pomocniczego dr hab. Sebastiana Tarcza, w Zakładzie Zoologii Doświadczalnej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zasługuje na wyróżnienie. Zawiera ona wiele elementów nowości naukowej, cele pracy zostały jasno określone, a badania właściwie wykonane. Wnoszę przeto do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt o dopuszczenie pani mgr Natalii Sawki do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Włodzimierz Korohoda