



Prof. dr hab. Jarosław Marszałek
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG/GUM
ul. Kładki 24; 80-822 Gdańsk
tel. +48 58 523 6313
tel./fax. +48 58 523 6427
E-mail: jaroslaw.marszalek@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk 21 08 2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marcina Plecha, zatytułowanej "Experimental analysis of genetic robustness in natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae*"

Zdolność do funkcjonowania i przeżycia pomimo nieustannie pojawiających się zmian informacji genetycznej czyli mutacji jest powszechnie obserwowaną cechą organizmów żywych. W literaturze naukowej zjawisko to, znane jako stabilność fenotypu (ang. robustness), było analizowane już w latach 50-60tych XX wieku. Jednak ostatnio badania mechanizmów odpowiedzialnych za stabilność fenotypu zyskały na znaczeniu ponieważ powiązано ją ze zdolnością organizmów do ewolucji oraz adaptacji do nowych środowisk. Ponad to rozwój technik badawczych w tym przede wszystkim genomiki, proteomiki i metabolomiki pozwolił na doświadczalne badania tego zjawiska.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za stabilność fenotypu drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Wybór tego organizmu do badań doświadczalnych uważam za bardzo dobrze uzasadniony. Sekwencja genomu drożdży jest znana od wielu lat. Dysponujemy również znaczną ilością informacji na temat ekspresji genów, oddziaływań pomiędzy białkami oraz dynamiki metabolizmu drożdży. Dostępne są zarówno laboratoryjne i przemysłowe jak też naturalne szczepy drożdży. Zaś możliwości manipulacji genetycznych w komórkach drożdży nie mają sobie równych wśród organizmów modelowych.

W pracy autor skoncentrował się na dwóch problemach: Po pierwsze, czy w przypadku krzyżowania udomowionych i naturalnych szczepów drożdży dojdzie do zjawiska heterozji- czyli zwiększonej żywotności pokolenia F1 w porównaniu ze szczepami rodzicielskimi. W ten sposób szukano odpowiedzi na pytanie, czy drożdże udomowione i dzikie różnią się obciążeniem genetycznym, czyli ilością zakumulowanych mutacji szkodliwych oraz czy zjawisko dominacji odpowiada za buforowanie efektów mutacji szkodliwych. Po drugie, jakie mechanizmy molekularne odpowiadają za buforowanie efektów mutacji szkodliwych wprowadzonych w sposób sztuczny.

Oceniana rozprawa składa się z 4 głównych części: wstępu teoretycznego, manuskryptów dwóch publikacji oraz podsumowania. Ponad to w pracy napisanej w języku angielskim mamy streszczenia polskie i angielskie oraz wspólny dla wszystkich części spis cytowanego piśmiennictwa.

We wstępie autor przedstawił zagadnienia teoretyczne oraz najważniejsze wyniki doświadczalne, które zainspirowały go do podjęcia badań. W kolejnych podrozdziałach

omówił: wpływ mutacji na dostosowanie organizmu, przyczyny stabilności fenotypu w obliczu akumulacji mutacji, znaczenie zjawisk dominacji, recesywności, epistazy oraz redundancji genetycznej, czyli obecności zduplikowanych genów w genomie, dla stabilności fenotypu. W dalszych częściach omówił dwie główne hipotezy wyjaśniające zjawisko stabilności fenotypu. Pierwszą opartą na koncepcji, że stabilność fenotypu jest cechą, która pojawiła się w wyniku działania doboru naturalnego. Dlatego odpowiadają za nią mechanizmy molekularne, na przykład białka opiekuńcze, które ewoluowały jako odpowiedź na presję selekcyjną wywołaną zapotrzebowaniem na stabilność fenotypu. Autor dość krytycznie odniósł się do tej hipotezy. Drugą zakładającą, że stabilność fenotypu pojawiła się jako skutek uboczny złożonej organizacji systemów biologicznych funkcjonujących na poziomie komórki i organizmu. Jako przykłady takich systemów wymienił modułarną organizację sieci wzajemnych oddziaływań białek komórkowych oraz hierarchiczną organizację systemów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów. Również przy omawianiu tej koncepcji autor zachował zdrową dawkę sceptycyzmu. W ostatniej części wstępu autor przedstawił powiązania pomiędzy stabilnością fenotypu wobec mutacji a procesem ewolucji i adaptacji organizmów do nowych nisz środowiskowych. Autor przedstawił popularną obecnie koncepcję, że utrzymanie zmienności genetycznej organizmu dzięki mechanizmom buforowania mutacji szkodliwych może w warunkach zmiany środowiska przyspieszać lub wręcz umożliwiać proces adaptacji. Wszystkie te zagadnienia omówione są wyczerpująco oraz poparte dobrze dobranym piśmiennictwem zarówno współczesnym jak też bardziej tradycyjnym. Wstęp teoretyczny czyta się bardzo dobrze i moim zdaniem jest on dobrym wprowadzeniem do badań przedstawionych w dalszych częściach rozprawy. Świadczy on o tym, że autor swobodnie porusza się w zagadnieniach związanych z problematyką buforowania mutacji zarówno w kontekście ewolucyjnym jak też funkcjonalnym.

Pierwszy z dwóch manuskryptów stanowiących główną część ocenianej rozprawy jest zatytułowany "Heterosis in domesticated and wild strains of *Saccharomyces cerevisiae*". W pracy tej wykorzystano kolekcję szczepów drożdży zarówno udomowionych jak też izolowanych z naturalnego środowiska, które po odpowiednich modyfikacjach genetycznych krzyżowano ze sobą aby odpowiedzieć na pytanie czy dostosowanie pokolenia F1 różni się od dostosowania szczepów rodzicielskich. Oryginalność i siła tego pomysłu polegała na zastosowaniu szczepów o precyzyjnie znanym pokrewieństwie oraz na ocenie dostosowania, w tym przypadku tempa podziałów komórkowych, w szerokim zakresie warunków hodowli. Nowatorskie było zastosowanie do pomiarów tempa wzrostu nie tylko tradycyjnych hodowli płynnych ale również hodowli na podłożach stałych prowadzonych w warunkach silnego stresu. W tym ostatnim przypadku tempo wzrostu określano na podstawie komputerowej analizy zdjęć rosnących komórek. Otrzymane wyniki poddano rygorystycznej analizie statystycznej i to pozwoliło na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków pomimo tego, że jak można było się spodziewać, obserwowane różnice w tempie wzrostu, nie były dramatyczne. Najważniejsze osiągnięcia tej pracy to pokazanie, że zjawisko heterozji występuje w przypadku szczepów udomowionych a jego siła, jak przewidywała teoria, jest proporcjonalna do dystansu genetycznego pomiędzy szczepami rodzicielskimi. Wyniki te sugerują, że szczepy udomowione, zarówno laboratoryjne jak też przemysłowe, akumulują mutacje szkodliwe, których efekty są maskowane w pokoleniu F1 przez nieuszkodzone kopie genów. Inna ciekawa obserwacja to, że szybszy wzrost w warunkach bardzo silnego stresu nie koreluje z polepszeniem wzrostu w innych warunkach bardzo silnego stresu. Jak również, że w przypadku bardzo silnego stresu tempo wzrostu pokolenia F1 jest słabo skorelowane z fenotypami rodziców. W dyskusji autor omówił uzyskane wyniki w kontekście danych literaturowych zarówno teoretycznych jak też doświadczalnych. Dyskusja jest wyczerpująca i w istotny sposób wzbogaca uzyskane wyniki. To połączenie oryginalnych wyników i ich dogłębnej analizy czyni oceniany manuskrypt istotnym wkładem do naszej wiedzy na temat zjawiska kompensacji negatywnych efektów mutacji na poziomie fenotypowym.

W czasie lektury dyskusji zaintrygowała mnie przedstawiona w niej hipoteza, że brak heterozji obserwowany w przypadku krzyżówek szczepów dzikich mógł wynikać z dwóch przeciwstawnych efektów. Z jednej strony podwyższenie tempa wzrostu wynikające z maskowania genów uszkodzonych przez mutacje poprzez ich nieuszkodzone kopie a z drugiej strony obniżenie tempa wzrostu wynikające z braku kompatybilności pomiędzy nowymi kombinacjami alleli pojawiającymi się w pokoleniu F1. Wiadomo, że w lokalnych populacjach allele funkcjonujące w danym procesie biologicznym mogą ko-ewoluować dostosowując się do siebie nawzajem. Zaburzenie tych dostosowanych do siebie kombinacji alleli w pokoleniu F1 może prowadzić do obniżenia tempa wzrostu. W pracy nie znalazłem jednak zbyt wielu informacji na temat ko-ewolucji genów i ich znaczenia dla lokalnych adaptacji środowiskowych.

Pytanie do doktoranta: Proszę aby w czasie obrony doktorant przedyskutował zjawisko ko-ewolucji i niekompatybilności genów przedstawiając wybrane dane literaturowe ilustrujące znaczenie tego procesu dla dostosowania mieszańców. Jak można sprawdzić czy zjawisko to miało miejsce w przypadku badanych szczepów drożdży?

Drugi manuskrypt nosi tytuł "Genetic robustness in yeast depends on energy metabolism". Autor poddał indukowanej mutagenezie tą samą kolekcję szczepów udomowionych i dzikich aby zbadać jakie procesy komórkowe odpowiadają za maskowanie na poziomie fenotypowym negatywnych efektów mutacji. Podobnie jak w przypadku pierwszej pracy doświadczenia zostały precyzyjnie zaplanowane i starannie przeprowadzone. Efektywność mutagenezy kontrolowano za pomocą markerowego genu URA3. Dostosowanie zmutowanych szczepów badano jako tempo wzrostu i przeżywalność. Przy czym zarówno wydajność mutagenezy jak też wzrost i przeżywalność sparametryzowano co umożliwiło rygorystyczną analizę statystyczną otrzymanych wyników. Dzięki temu, że zadbano o to aby doświadczenia prowadzić w warunkach porównywalnych do tych jakie stosowali inni badacze analizujący transkryptom i proteom badanych szczepów doktorant mógł wykorzystać dane literaturowe podczas analizy własnych wyników.

Podobnie jak w przypadku pierwszej pracy manuskrypt jest bardzo dobrze napisany. Wstęp przedstawia stan wiedzy, który zainspirował doktoranta do podjęcia badań. Wyniki są dobrze opisane i czytelnie zilustrowane. Dyskusja dobrze podsumowuje uzyskane wyniki w kontekście zarówno rozważań teoretycznych jak też dostępnych danych doświadczalnych. Analizując toksyczne efekty stosowanego mutagenu (EMS) doktorant wykazał, że efekt ten jest silniejszy w przypadku komórek nadprodukcujących białka uczestniczące w transporcie anionów i aminokwasów, zaś słabszy w przypadku komórek nadprodukcujących białka uczestniczące w biogenezie rybosomu. Te łatwe do interpretacji funkcjonalnej wyniki utwierdziły doktoranta, że może wiarygodnie wykorzystać dane literaturowe dotyczące transkryptomu i proteomu badanych szczepów do analizy swoich wyników wpływu mutacji na tempo wzrostu drożdży. Najciekawszą obserwacją przedstawioną w manuskrypcie jest pozytywna korelacja pomiędzy zdolnością buforowania negatywnych efektów mutacji na tempo wzrostu drożdży a ekspresją genów zaangażowanych w metabolizm energetyczny komórki. Doktorant zaproponował, że buforowanie negatywnych efektów mutacji zachodzi wydajnie w komórkach zdolnych do efektywnej syntezy ATP. Doktorant nie stwierdził natomiast występowania korelacji pomiędzy zdolnością do buforowania mutacji a zwiększoną ekspresją genów odpowiedzialnych za niwelowanie skutków stresu w tym również białek opiekuńczych. Ten ostatni wynik jest ważny, ponieważ istnieje obszerna literatura sugerująca bezpośredni udział białek opiekuńczych, a w szczególności Hsp90 i Hsp60, w buforowaniu skutków mutacji. W związku z uzyskanymi wynikami nasunęło mi się kilka pytań.

Pytanie do doktoranta: Biorąc pod uwagę, że buforowanie mutacji koreluje ze zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w metabolizm energetyczny można by przypuszczać, że pewne mierzalne parametry metaboliczne takie jak pula nukleotydów adeninowych wyrażana jako ładunek energetyczny adenylanów LEA ($LEA = [ATP] + 0.5[ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$) lub poziom mitochondrialnych cytochromów, który można mierzyć spektrofotometrycznie w całych komórkach, powinny korelować ze zdolnością do buforowania mutacji. Te parametry można by stosunkowo łatwo mierzyć w komórkach badanych przez doktoranta. W czasie obrony proszę ustosunkować się do tego pomysłu.

Pytanie do doktoranta: Autor dość kategorycznie stwierdza, zarówno w dyskusji drugiego manuskryptu jak też w podsumowaniu rozprawy, że białka opiekuńcze nie uczestniczą w buforowaniu efektów mutacji szkodliwych. Wniosek ten opiera na braku korelacji pomiędzy zwiększoną ekspresją genów kodujących białka opiekuńcze a zdolnością komórek do buforowania negatywnych efektów mutacji. Tymczasem moim zdaniem fakt, że zdolność produkcji ATP koreluje ze zdolnością buforowania mutacji może sugerować udział białek opiekuńczych w tym procesie. Proszę aby w czasie obrony doktorant ustosunkował się do tego stwierdzenia biorąc pod uwagę poznane mechanizmy działania białek opiekuńczych w komórce drożdży.

Rozprawę kończy podsumowanie czyli "Concluding remarks". W tym rozdziale doktorant podsumował otrzymane wyniki i ponownie omówił je w kontekście danych literaturowych. Rozdział ten kończy stwierdzenie, że stabilizacja fenotypu umożliwia adaptacje ale sama nie jest adaptacją, czyli jak rozumiem, nie powstała w wyniku bezpośredniego działania doboru naturalnego.

Pytanie do doktoranta: proszę skomentować czy prawidłowo odczytałem ostatnie zdanie tej rozprawy.

Bardzo wysoko oceniam przygotowaną przez mgr Plecha rozprawę doktorską. Jednak obowiązek recenzenta nakazuje zastanowienie się czy można by ją jeszcze poprawić. Nasuwają mi się dwie sugestie. Po pierwsze we wstępie teoretycznym doktorant mógł poświęcić więcej miejsca opisowi modeli doświadczalnych, które stosowano w badaniach literaturowych omawianych w tym rozdziale. Wydaje mi się, że doktorant przyjął założenie, że rozdział ten powinien być napisany w stylu podobnym do wstępu do publikacji doświadczalnej. Tymczasem takie wstępy są częścią rozdziałów 2 i 3. Myślę, że wstęp teoretyczny byłby jeszcze lepszy gdyby był napisany bardziej w stylu pracy przeglądowej, czyli nie tylko omawiając otrzymany w cytowanej literaturze wynik ale również krótko prezentując jak ten wynik został uzyskany. Z kolei w podsumowaniu mogłoby się znaleźć kilka zdań na temat przyszłych planów badawczych. Nie w znaczeniu, że doktorant ma obowiązek kontynuowania tych badania ale raczej jako wprawka intelektualna, która pozwoliłaby pokazać, że doktorant w pełni rozumie konsekwencje uzyskanych wyników.

Podsumowanie: Recenzowaną pracę oceniam bardzo wysoko. Doktorant zastosował współczesne metody doświadczalne i analityczne aby odpowiedzieć na klasyczne pytania biologii doświadczalnej. Dzięki rygorowi intelektualnemu postawionych pytań, staranności przeprowadzonych prac doświadczalnych oraz ich rzetelnej analizie ilościowej uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do naszej wiedzy na temat biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za kompensowanie efektów mutacji szkodliwych. Jestem przekonany, że publikacje przygotowane w oparciu o ocenianą rozprawę będą czytane, dyskutowane i dobrze cytowane. Doktorant niewątpliwie wniósł oryginalny i ważny wkład do wiedzy biologicznej co jest warunkiem niezbędnym do uzyskania stopnia naukowego doktora. Wnoszę do Rady

Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ o umożliwienie mgr Marcinowi Plechowi przystąpienia do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie za względu na dużą wartość naukową otrzymanych wyników, wysoką jakość przygotowanych manuskryptów i rzetelne opracowanie rozprawy doktorskiej wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Jarosław Marszałek

