

mgr inż. 13.08.2018

prof. dr hab. Andrzej Falniowski  
Zakład Malakologii  
Instytut Zoologii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej

**mgr inż. Marka Lubośnego**

***„Podwójnie uniparentalny system dziedziczenia mitochondriów u małży. Transkryptomika, mitogenomika oraz nadliczbowe ramki odczytu: analiza funkcjonalna”***

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Artura Burzyńskiego prof. IO PAN,

w Zakładzie Genetyki i Biotechnologii Organizmów Morskich  
Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii nauk w Sopocie

Mitochondria, jako jedna z organelli powstałych w wyniku symbiozy, posiadają własny genom, wprawdzie niewielki, lecz pełniący w komórce ważne funkcje. Ewoluuje on szybciej niż genom jądrowy, i u niemal wszystkich zwierząt dziedziczony jest uniparentalnie, w linii matecznej. Pozwala to na stosunkowo proste rekonstruowanie pokrewieństw – jak długo czas dywergencji nie jest zbyt odległy – a ponadto umożliwia na rekonstrukcję pokrewieństw, w formie hierarchicznego drzewa, od poziomego wewnątrzpopulacyjnego po niezbyt odległe od siebie gatunki, czym zajmuje się stworzona przez Avise'a filogeografia. U niektórych małży jest jednak inaczej: oprócz „typowego” matczynego genomu, przekazywanego potomstwu obu płci, występuje też genom męski, przekazywany jedynie męskiej części potomstwa. Wynikiem jest heteroplazmia, której odmiennosc sięga nawet kilkudziesięciu procent. Nie

potrafimy wciąż zrozumieć ani mechanizmu, ani funkcji tego podwójnie uniparentalnego dziedziczenia. Zarazem obecność dwóch wyraźnie odmiennych genomów stwarza możliwości lepszego poznania dziedziczenia mitochondrialnego DNA – choćby zaskakująca dla badaczy rekombinacja mtDNA, wykazana właśnie na tych małżach. Najczęściej obiektem badań są omułki z rodzaju *Mytilus*, małże o światowym zasięgu, zapewne jedyni przedstawiciele zoobentosu osiągający biomasę kilku kilogramów na metr kwadratowy dna, hodowane i jadane przez człowieka.

Recenzowana praca doktorska dotyczy właśnie genomów mitochondrialnych małży. Przedstawia wyniki badań, przeprowadzonych rzetelnie i nowoczesnymi technikami, nad trzema zagadnieniami z tego zakresu. Praca liczy 84 strony, zawiera 20 rycin i 6 tabel. Literatura liczy 145 pozycji, prawidłowo zestawionych. Wyniki poprzedza bardzo rozbudowany wstęp, który oczywiście nie znajdzie miejsca w wersji przeznaczonej do publikacji. Na 37 stronach mieści się streszczenie, abstract, wykaz skrótów, „właściwy” wstęp omawiający rodzaj *Mytilus*, mitochondrialne DNA, hermafrodytyzm, podwójnie uniparentalny system dziedziczenia mitochondriów, ORF u małży i postulowany brak *atp8* u małży. Dalej opisano NGS, czyli sekwencjonowanie nowej generacji. Część ta dowodzi dobrej orientacji Doktoranta w temacie, ale oczywiście jest zbędna. Nienajlepszą praktyką jest niepodanie, za wyjątkiem ryciny pierwszej, źródeł rycin. Ponadto, zgodnie z ICZN, długa lista gatunków małży, u których wykazano podwójnie uniparentalne dziedziczenie mtDNA, a także wszelkie nazwy gatunków użyte w tekście po raz pierwszy, powinny być kompletne, czyli zawierać nazwiska autorów i daty opisu. Dalej następują cztery strony opisu technik (zbędne), po czym dwie strony opisu programów komputerowych (niepotrzebne). Następne dziewięć stron to kolejne opisy kolejnych technik – niepotrzebnie szczegółowe. Znow trzynaście ilustracje, bez podania źródeł. Przecież nie są to oryginalne wyniki Autora, a gdyby były, to też powinny być zaznaczone, a zresztą wówczas musiałyby trafić do wyników.

Pierwszym z postawionych przez Doktoranta pytań dotyczyło możliwości wykazania, techniką NGS RNAseq, ewentualnego podwójnie uniparentalnego dziedziczenia mitochondrialnego DNA u pacyficznego małża *Eurhomalea rufa*. Występowania tego zjawiska można się było spodziewać, bowiem *E. rufa* należy do rodziny Veneridae, gdzie dotychczas wykazano je o trzech przedstawicieli (*nota bene*, zgodnie z ICZN, *Meretrix lamarckii*, nie „*Lamarckii*”). Ta część rozprawy została już częściowo opublikowana w *Marine Genomics*. Zastosowana technika powinna umożliwić wyróżnienie dwóch genomów mitochondrialnych, zwłaszcza że można by się spodziewać dywergencji na poziomie co najmniej 10%. Takiego zróżnicowania nie znaleziono, a więc podwójnie uniparentalnego dziedziczenia u tego małża wykazać się nie da.

Niejako przy okazji wykorzystano uzyskane sekwencje oksydazy cytochromowej do wnioskowania o pokrewieństwach tego gatunku. Tu jednak, a zwłaszcza dla zamieszczonego na s. 55 drzewa mającego obrazować pokrewieństwa pomiędzy wybranymi gatunkami rodziny Mytilidae, nasuwają się poważne zastrzeżenia. Po pierwsze: podstawą tego typu rekonstrukcji pokrewieństw jest założenie, że obserwowane zróżnicowanie odzwierciedla liczbę zmian w badanej sekwencji, czyli odzwierciedla, lepiej lub gorzej, długość czasu od ostatniego wspólnego przodka. Takie założenie nie da się zaakceptować dla odległości  $p$  równych 0,3 czy nawet 0,1. Zwyczajnie przy tak dużej dywergencji obserwowana różnica nie odzwierciedla poziomu zmian, które zaszły w trakcie ewolucji, niewątpliwie wiele było mutacji wielokrotnych, wstecznych, itd. Należałoby więc estymować model ewolucji, a następnie użyć odpowiedniej odległości. To zresztą i tak specjalnego sensu nie ma, bowiem programy oparte na odległościach to już raczej anachronizm. Neighbor-joining, zaproponowane przez Nei, jest wciąż znakomite i szeroko wykorzystywane do wstępnej estymacji drzewa, gdy taksonów jest wiele. Było też niezastąpione w czasach kalkulatorów. Obecnie należałoby użyć techniki maksymalizacji

wiarygodności (maximum likelihood), odpowiednio dobierając model. Nawet MEGA na to pozwala, choć nie wyobrażam sobie publikowania drzew obliczonych tym pakietem, nadającym się jedynie do wstępnych, roboczych analiz. Ponadto – w odróżnieniu od neighbor joining – można by wtedy wyliczyć (a raczej koniecznie trzeba by było) poziomy wiarygodności kolejnych kładów, techniką bootstrap. Inaczej wnioski o pokrewieństwach są zwyczajnie nieuprawnione.

Drugie z postawionych pytań dotyczyło obecności w genomie mitochondrialnym omułek *Mytilus* dodatkowej, czternastej ramki odczytu – czy koduje ona białko mogące brać udział w mechanizmie dziedziczenia mitochondriów u małży, u których wykazano DUI. Zważywszy, że o mechanizmie takiego dziedziczenia mitochondriów wiemy bardzo niewiele, taka możliwość jest szczególnie interesująca. Tym bardziej, że obecność tej dodatkowej ramki wydaje się skorelowana z występowaniem podwójnie uniparentalnego dziedziczenia mtDNA. Doktorant wykorzystał cały szereg nowoczesnych i pracochłonnych technik, uzyskując wyniki nie do końca jednoznaczne. Rzeczywiście wykazano obecność białka, choć o dość dziwacznej strukturze, ale możliwego do uzyskania jedynie na drodze transkrypcji tej ramki mtDNA z użyciem kodu jądrowego, nie mitochondrialnego. Tak więc mitochondrialny zapis musiałby być przepisywany na białko z wykorzystaniem jądrowego RNA. Intuicyjnie wydaje się to zrozumiałe – segregacja mitochondriów w zygocie zachodzi przecież w cytoplazmie i tam właśnie takiego białka, mającego udział w tym procesie, należy się spodziewać. W sumie przedstawione przez Doktoranta wyniki poszerzają naszą wiedzę w tym temacie i ograniczają zakres niepewności, choć, jak to podkreśla sam Doktorant, dalsze badania są niezbędne.

Trzecie pytanie dotyczyło obecności u *Mytilus edulis* mitochondrialnego białka ATP8, którego brak wskazywano dla tych i wielu innych małży. Technika immunodetekcji wykazała męską wersję tego białka, lecz jedynie w

płaszczu (tan leżą gonady) samców. Żeńska wersja występowała natomiast we wszystkich tkankach samic, a także samców, lecz u tych ostatnich w płaszczu było jej niewiele. Potwierdzono też obecność ATP8 innymi metodami. Wyniki tej części rozprawy zostały już opublikowane.

Przedstawiona rozprawa doktorska niewątpliwie wydatnie poszerza naszą wiedzę dotyczącą genomów mitochondrialnych i spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych u tytule naukowym (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 r.), z późniejszymi zmianami (Dz. U. Nr 164, poz. 1365 z 2005 r.; Dziennik Ustaw z 21 kwietnia 2011 Nr 84 poz. 455), oraz Ustawy z dnia 21 kwietnia 2017 r. (Dz. U. z 2017, poz. 859) o zmianie ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz niektórych innych ustaw, stawiane rozprawom doktorskim, i może stanowić podstawę do ubiegania się przez Kandydata o stopień doktora.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr inż. Marka Lubośnego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę również o nagrodzenie ocenianej rozprawy.

Kraków, 9.08.2019

  
prof. dr hab. Andrzej Falniowski