



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.  
Zakład Ekspresji Genów

7.08.2019, Poznań

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marka Lubośnego zatytułowana  
„Podwójnie uniparentalny system dziedziczenia mitochondriów u małży.  
Transkryptomika, mitogenomika oraz nadliczbowe ramki odczytu: analiza  
funkcjonalna**

Praca doktorska mgr inż. Marka Lubośnego została wykonana w Zakładzie Genetyki i Biotechnologii Organizmów Morskich Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie, a promotorem pracy jest prof. nadzw. IO PAN dr hab. Artur Burzyński. Przewód doktorski przeprowadza Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

W Zakładzie Genetyki i Biotechnologii Organizmów Morskich Instytutu Oceanologii PAN, którym kieruje dr hab. Artur Burzyński, od wielu już lat prowadzi się konsekwentnie badania nad systemami dziedziczenia mitochondriów u małży, ze szczególnym uwzględnieniem małży z rodzaju *Mytilus*. U szeregu bowiem gatunków tego rodzaju (ale nie tylko) wykryto niespotykane zjawisko sposobu dziedziczenia mitochondriów, które nazwano uniparentalnym systemem dziedziczenia mitochondriów (DUI, ang. Double Uniparental Inheritance). Polega ono na dodatkowym przekazywaniu przez osobniki męskie męskiego typu mitochondrialnego DNA (M mtDNA). W efekcie osobniki żeńskie posiadają zasadniczo tylko mitochondria odziedziczone po matce (F mtDNA) (męskie mitochondria wprowadzane przez plemnik ulegają rozproszeniu i są niewykrywalne), a osobniki męskie charakteryzują się heteroplazmią i w tkankach somatycznych mają mitochondria pochodzenia matczynego, a w tkance generatywnej – mitochondria pochodzenia ojcowskiego. Fascynujący jest przebieg procesu przekazywania mitochondriów męskich – mitochondria z plemnika pozostają długo razem w jednej komórce dzielącego się zarodka, a docelowo są dominującą frakcją wyłącznie w tkankach generatywnych. Nieznany natomiast jest mechanizm usuwania mitochondriów męskich z komórek osobników żeńskich. Frapującym jest pytanie czemu u



szeregu małży wykształcił się opisany mechanizm dziedziczenia mitochondriów i jakie ma on znaczenie w biologii tych zwierząt. Jak widać z tego już pobieżnego opisu stanu badań nad systemem DUI dziedziczenia mitochondriów u wybranych gatunków małży – pozostaje wiele kwestii do wyjaśnienia, w tym główne pytanie o znaczenie biologiczne i mechanizm tego procesu.

W pracy doktorskiej mgr inż. Marka Lubośnego postawiono sobie za cel odpowiedź na trzy pytania:

1. Czy w gatunku *Eurhomalea rufa*, bliskim krewniakowi gatunku *Venerupis philippinarum*, w którym zaobserwowane zjawisko DUI, również występuje to samo zjawisko?
2. Czy nadliczbowa czternasta ramka odczytu w genomie mitochondrialnym małży *Mytilus edulis* koduje białko ważne w procesie DUI?
3. Czy, jak twierdzą niektórzy autorzy, „brakujące” w mitochondriach niektórych małży białko ATP8 – podjednostka syntazy ATP, jest eksprymowane w formie aktywnej przez oba genomy mitochondrialne małży z gatunku *Mytilus edulis*?

W mojej opinii Autor dysertacji doktorskiej odpowiedział w pełni na pierwsze i trzecie pytanie, natomiast dane uzyskane w przypadku drugiego pytania nie odpowiadają wprost i rodzą kolejne pytania.

Odpowiadając na pierwsze pytanie czy u *Eurhomalea rufa*, bliskim krewniakowi gatunku *Venerupis philippinarum*, w którym zaobserwowano zjawisko DUI, również występuje to samo zjawisko Autor zastosował technikę sekwencjonowania RNA (RNA seq) w technologii Illumina. RNA izolowano z tkanek generatywnych (gonad) małża, osobników męskich i żeńskich. Tutaj mam pierwsze pytanie, gdyż zdziwiło mnie, że izolowany RNA z osobników męskich i żeńskich był łączony i wspólnie poddawany sekwencjonowaniu. W materiałach i metodach nie doczytałam się, by adaptory przy generowaniu bibliotek do NGS były różne. Zatem Autor poddał sekwencjonowaniu wspólny transkryptom męski i żeński. Może szkoda, bo Autor miałby bogatszy i bardziej zdefiniowany materiał do ewentualnych dalszych analiz. „Wyizolowany” z danych głębokiego sekwencjonowania transkryptom mitochondrialny



*Eurhomalea rufa* koduje 13 jednostek transkrypcyjnych tłumaczonych następnie na sekwencję białek oraz dwie podjednostki mt rRNA. Stosując sekwencję nukleotydową genu *cox1* Autor obliczył odległości genetyczne między gatunkami małży z rodziny Mytilidae. Ciekawym wynikiem tej analizy jest fakt, że uznawane na podstawie badań morfologicznych za bardzo blisko spokrewnione *Eurhomalea rufa* i *Eurhomalea lenticularis* wcale takie nie są w analizie molekularnej, opartej, tu trzeba to podkreślić, na analizie sekwencji jednego genu. W moim przekonaniu szkoda, że Autor badania oparł tylko na jednym genie, miał przecież ż do dyspozycji znacznie więcej genów mitochondrialnych do porównania (mam nadzieję, że takie dane są również dostępne dla *Eurhomalea lenticularis*?). Najważniejszym jednak wynikiem jest to, że nie zidentyfikowano heteroplazmatycznych sekwencji transkryptów mitochondrialnych (różnych dla mitogenomu męskiego i żeńskiego) w transkryptomie *Eurhomalea rufa*, co przy założeniu, że nie doszło w bardzo niedawnym czasie do rekombinacji pomiędzy mitogenomami żeńskim i męskim, świadczy o tym, że małż ten nie posiada podwójnie uniparetalnego systemu dziedziczenia mitochondriów. Wynik ten jest zasadniczo oczywisty i został opublikowany w Marine Genomics, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem. Natomiast mam pewien niedosyt gdy chodzi o przedstawienie danych w pracy doktorskiej: Autor mógłby nieco bardziej scharakteryzować co prawda niepełny transkryptom jądrowy, który uzyskał w wyniku RNA seq, a ponadto w sekcji „Wyniki” przedstawienie rezultatów i analiza uzyskanych danych urywają się gwałtownie bez nawet jednego zdania konkluzji. Odpowiadając na pozostałe pytania w swojej pracy doktorskiej Autor już tego błędu nie popełnił. Jednak pozytywnym efektem takiego przedstawienia wyników jest to, że przerwałam czytanie wyników i czytałam część dyskusji odnoszącą się do tych wyników, bo paliła mnie ciekawość jaki jest ostateczny rezultat badań. Drugie pytanie, odnoszące się do funkcji tajemniczej 14-tej ORF jest w moim przekonaniu najciekawsze w całej pracy. Przede wszystkim Autor musiał udowodnić, że białko w ogóle powstaje ze zidentyfikowanej 14-tej ORF. Argumentami przemawiającymi za tym jest występowanie tej ramki u blisko



spokrewnionych gatunków tworzących kompleks *Mytilus edulis*, a także u odleglejszych ewolucyjnie gatunków z rodzaju *Mytilus*, a to sugeruje, że badana ORF jest utrzymywana w tej linii ewolucyjnej przez przynajmniej 13 milionów lat. Hipotetyczna sekwencja białkowa jest konserwowana ewolucyjnie między gatunkami z rodziny *Mytilus*, a w bazie EST znajdują się sekwencje cDNA odpowiadające transkryptom tej ramki. By wykazać obecność tego białka w małżach Autor przygotował dwa rodzaje przeciwciał na hipotetyczne białko FORF – zgodnie z kodem genetycznym dla mitochondriów bezkręgowców i zgodnie ze standardowym kodem genetycznym. Analiza western blot przy wykorzystaniu poliklonalnych przeciwciał zaprojektowanych na białko FORF zgodnie z kodem genetycznym mitochondriów bezkręgowców (MFORF) nie dała sygnału identyfikacji białka w żadnej z izolowanych tkankach męskich i żeńskich. Tu jednak muszę skrytykować przedstawiony wynik: w moim przekonaniu brak tutaj pozytywnej kontroli na obecność białka powszechnie występującego we wszystkich tkankach badanych zwierząt (aktywny, translacyjny czynnik elongacyjny?) będący kontrolą nałożenia ilościowego i jakościowego mieszaniny białek. Bez takiej kontroli trudno odnieść się do przedstawionego doświadczenia. Detekcja MFORF ulegającego ekspresji w komórkach bakteryjnych sprawy nie załatwia. Ten sam błąd został powtórzony w analizie western blot z zastosowaniem przeciwciał na GFORF, choć w tym przypadku uzyskano bardzo ciekawy wynik wskazujący na ekspresję GFORF tylko w płaszczu/gonadach osobników męskich. Jednak bez omawianej powyżej kontroli wynik ten jest trudny do interpretacji. Mieszaniny białek poddano sekwencjonowaniu (spektrometrii mas) i uzyskano odczyty pokrywające 45% całkowitej długości 14-tej ORF tłumaczonej kodem standardowym. Bardzo podoba mi się dalsza analiza obecności tego białka i jego genu pod kątem czy jest to gen kodowany jądrowo czy mitochondrialnie. Otóż dysponując wynikami DNA seq *Mytilus edulis* z Tasmanii i *Mytilus trossulus* (z Bergen) złożono na tej podstawie po jednym genomie mitochondrialnym typu F (ORF jest zarówno w mito MDNA jak i mito FDNA). *M. trossulus* z Tasmanii jest wyjątkowy, gdyż nie posiada 14-tej ORF, stąd dane uzyskane z sekwencjonowania DNA seq tego



małża nadają się idealnie do poszukiwania *forf* ewentualnie kodowanych jądrowo. Analizując dane z surowych odczytów NGS DNA seq dla obu małży w przypadku *M. trossulus* zidentyfikowano odczyty pasujące do 14tej ORF, a w przypadku *M. edulis* z Tasmanii – nie. Można zatem sugerować, że badana ramka odczytu nie jest kodowana przez genom jądrowy, choć ze 100% pewnością tego wykluczyć się nie da. Mam tu jednak pewne pytania do Kandydata, mianowicie czy w takim razie kod genetyczny mitochondriów u przynajmniej badanych małży były standardowy? Czy jest to możliwe? Na ile „uniwersalny” jest mitochondrialny kod genetyczny bezkręgowców? Czy można na to pytanie odpowiedzieć analizując zidentyfikowane trzynaście transkryptów kodujących białka w mitochondriach badanych małży i odpowiednie dla nich białka, z uzyskanych sekwencji dzięki zastosowaniu spektrometrii mas? Ciekawa kontynuacja tej dyskusji znajduje się na stronach 56 – 58 ale jakby na zadane powyżej pytanie nie znalazłam tam odpowiedzi. Ponadto chciałam zapytać czy nie można wyizolować plemników i sprawdzić ekspresję GFORF, zamiast stosować do tego płaszcz małża z tkanką generatywną? Czy w małżach możliwe jest stosowanie mutagenyzy w mitochondriach? Trzecie pytanie doktoratu dotyczyło odpowiedzi na pytanie czy podjednostka 8 (ATP8) syntazy ATP występuje w żeńskich i męskich mitochondriach badanych małży z rodzaju *Mytilus*. Stosując techniki western blot i BN-PAGE Autor potwierdził obecność tej podjednostki w mitochondrialnym kompleksie V. Wracając do szczegółów – doświadczenie western blot również nie zawiera pozytywnej kontroli ilości i jakości nałożenia mieszaniny białkowej. Stosując przeciwciała na męską wersję ATP8 (MATP8) pozytywny wynik uzyskano zgodnie z oczekiwaniem - tylko dla męskich osobników i to tylko w tkance płaszczu (plus tkanka generatywna), natomiast w przypadku przeciwciał skierowanych na żeńską formę ATP8 (FATP8) uzyskano pozytywny wynik dla wszystkich tkanek, również w przypadku osobników męskich, tyle że w przypadku płaszczu/tkanki generatywnej - sygnał był słabszy. BN-PAGE potwierdziła pięknie funkcjonalność identyfikowanej podjednostki syntazy ATP co wskazuje, że dane sugerujące brak badanej podjednostki w niektórych



gatunkach małży są najprawdopodobniej błędne. Wyniki dotyczące immunodetekcji ATP8 w analizowanych gatunkach małża zostały opublikowane w PeerJ, a Kandydat jest pierwszym autorem tej pracy.

Podsumowując omawianą pracę doktorską uważam, że zawiera wiele nowych danych dla nauki, stawia nowe pytania dotyczące mechanizmu DUI, urzeka mnie w niej również ciekawość do rozwiązywania podstawowych problemów naukowych. Niewielu jest zapewne badaczy pracujących nad zagadnieniami, którymi zajął się Kandydat w swojej pracy doktorskiej, tym większe budzi moje uznanie konsekwentne realizowanie zadań badawczych. Doktorant opanował wiele nowych technik biologii molekularnej – od badań bioinformatycznych po zaawansowane techniki pracy z białkami. Jeśli chodzi o sposób napisania pracy doktorskiej to stylowi pisania nie można nic zarzucić. Chwilami jednak jest ten tekst zbyt lapidarny, można by było nieco więcej napisać – np. gdy chodzi o wstęp – na temat kodów genetycznych w mitochondriach różnych eukariontów. Podoba mi się nietuzinkowy sposób przedstawienia materiałów i metod – najpierw istota techniki, a potem dopiero sposób wykonania.

Oceniam tę pracę doktorską bardzo dobrze, obfituje ona w konkretne, ciekawe wyniki, których część została już opublikowana. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie mgr inż. Markowi Lubośnemu stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Zofia Szweykowska-Kulińska