



UNIWERSYTET GDAŃSKI



Prof. dr hab. Jarosław Marszałek
Pracownia Biochemii Ewolucyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG/GUMed
Uniwersytet Gdański
ul. Antoniego Abrahama 8, 80-307 Gdańsk
tel. +48 58 523 6313
tel./fax. +48 58 523 6427
E-mail: jaroslaw.marszalek@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk 04.01.2019

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Karoliny Biesiadeckiej zatytułowanej
"Eksperymentalny test hipotez wyjaśniających zależność między tempem ewolucji
molekularnej i poziomem ekspresji genów".**

Wprowadzenie:

Fakt, że geny kodujące białka różnią się tempem ewolucji znany jest od początków badań nad ewolucją molekularną, czyli od lat 70 tych XX wieku. Różnice te są znaczące. Przykładowo sekwencja genów kodujących histony zmienia się w czasie ewolucji kilkadziesiąt razy wolniej niż sekwencja kodująca fibrynogeny odpowiedzialne za krzepliwość krwi. Początkowo różnice w tempie ewolucji molekularnej przypisywano różnej funkcji białek. Wydawało się oczywiste, że histony niezbędne dla przeżycia każdej komórki eukariotycznej, oddziałujące z DNA i innymi białkami, muszą ewoluować wolniej, bo większa część ich sekwencji zaangażowana jest w różnorodne funkcje. Podczas, gdy sekwencja fibrynogenu może się zmieniać szybko, bo nie ma znacznego wpływu na jego funkcję jako elementu strukturalnego skrzepu. Rozumując w ten sposób wyjaśniano różnice w tempie ewolucji białek. Sytuacja zmieniła się na początku XXI wieku, kiedy dostępność coraz większej liczby sekwencji genów kodujących białka pozwoliła na badanie tempa ich ewolucji metodami statystycznymi. Zadano pytanie: jakie czynniki wpływają na tempo ewolucji białek? Szybko okazało się, że trudno te czynniki zdefiniować i jeszcze trudniej wykazać ich wpływ na tempo ewolucji. Po wielu próbach zidentyfikowano jeden taki czynnik: poziom ekspresji genu kodującego białko. Okazało się, że może on wyjaśnić ok. 30% różnic w tempie ewolucji białek. Białka, których geny ulegają ekspresji na wysokim poziomie ewoluują wolniej niż białka ekspresowane na niskim poziomie. Ta reguła ma zastosowanie do różnych białek niezależnie od ich funkcji. Kolejny problem stanowiło wyjaśnienie tej zależności. Najpopularniejsze są dwie hipotezy. Pierwsza oparta o obserwację, że białka są wysoce niestabilnymi molekułami, które łatwo agregują, zwłaszcza gdy pojawiają się zmiany ich sekwencji będące skutkami mutacji. Powstające agregaty mogą być toksyczne dla komórki. Dlatego dobór naturalny powinien ograniczać zmiany sekwencji białek syntetyzowanych na wysokim poziomie, bo ich agregacja może skutkować powstaniem większych ilości toksycznych złożeń. Druga hipoteza zakłada, że białka syntetyzowane na wysokim poziomie zaangażowane są w większą liczbę oddziaływań funkcjonalnych i strukturalnych, a więc mutacje tych białek mogą zaburzać wiele różnych aspektów biologii komórki. Warto zwrócić uwagę, że hipotezy te nie są wzajemnie sprzeczne i obie mogą wyjaśniać niskie tempo ewolucji białek syntetyzowanych na wysokim poziomie. Dla

biochemika hipotezy te brzmią wiarygodnie, ponieważ opierają się na dobrze znanych molekularnych właściwościach białek. Doświadczalna weryfikacja tych hipotez zasługuje więc na szczególną uwagę. To było celem ocenianej rozprawy, w której testowano wpływ nadprodukcji białek różniących się tempem ewolucji molekularnej na tempo wzrostu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Strategia badawcza:

Badania oparto o nadprodukcję w komórkach drożdży białek paralogicznych, czyli takich, które są produktem duplikacji genu, różniących się poziomem ekspresji i tempem ewolucji molekularnej. U przodka *S. cerevisiae* doszło do duplikacji całego genomu i dlatego dysponujemy dużą liczbą paralogów, które spełniają powyższe kryterium. Dodatkowo, drożdże piekarnicze to idealny organizm modelowy do kontrolowanej nadprodukcji białek oraz do pomiaru tempa wzrostu w różnych warunkach hodowli.

Mocne strony: Uważam, że przeprowadzenie badań z użyciem drożdży piekarniczych było bardzo dobrym pomysłem. Szczep do nadprodukcji oraz użyty zestaw plazmidów przygotowano bardzo starannie i testowano pod względem powtarzalności- to wielka zaleta przyjętej strategii badawczej. Zastosowano również znaczną liczbę warunków hodowli, o których wiadomo, że wpływają na właściwości białek komórkowych - tym samym stworzono warunki uwrażliwiające komórki na nadprodukcję białek. Zadbano o to by pomiary tempa wzrostu były powtarzalne. Oprócz pomiarów wpływu poziomu nadprodukcji białka na tempo wzrostu drożdży w różnych warunkach hodowli testowano również bezpośrednią konkurencję pomiędzy szczepami nadprodukującymi paralogi. Podsumowując, postawiono bardzo jasną hipotezę badawczą: nadprodukcja białka ewoluującego szybciej powinna powodować większe zahamowanie tempa wzrostu drożdży- jeżeli prawdziwa jest hipoteza, że agregaty takiego białka są bardziej toksyczne dla komórki. Hipotezę tą weryfikowano za pomocą dobrze zaprojektowanych i starannie kontrolowanych doświadczeń. Bardzo wysoko oceniam strategię badawczą zastosowaną w ocenianej rozprawie.

Słabe strony: Mam jedno zastrzeżenie. Warunkiem weryfikacji hipotezy o większym negatywnym wpływie nadprodukcji białek ewoluujących szybko jest jednakowy poziom nadprodukcji obu paralogów- tego ewoluującego szybko i ekspymowanego w natywnych warunkach na niskim poziomie oraz tego ewoluującego wolno i ekspymowanego normalnie na wysokim poziomie. Do oceny poziomu białek w ekstrakcie komórkowym zastosowano test immunologiczny polegający na detekcji znacznika domeny ZZ bakteryjnego białka A. To dobra metoda pomiaru poziomu białek w ekstraktach komórkowych, ale należało by ją zweryfikować poprzez pomiar metodą alternatywną. Mam na myśli rozdzielanie elektroforetyczne ekstraktu komórkowego w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) połączony z detekcją nadprodukowanego białka zarówno za pomocą metody wykrywającej białko jak też metody immunologicznej. Pozwoliłoby to na obserwację położenia prążka nadprodukowanego białka w żelu i jego zgodność ze spodziewaną masą cząsteczkową. Sprawdzono by również czy znacznik wykrywany jest tylko w prążku białka czy też w warunkach nadprodukcji dochodzi do degradacji białka i istnieje pula wolnego znacznika. Sprawdzono by także czy stosowany znacznik jest wykrywany na tym samym poziomie dla par paralogów. Dodatkowe pomiary można by przeprowadzić dla wybranych paralogów różniących się znacznie poziomem ekspresji oraz tempem ewolucji. Proponowane doświadczenie kontrolne, które jest łatwe do przeprowadzania, nie wpływa na moją pozytywną ocenę strategii badawczej.

Interpretacja wyników:

Mocne strony: Wyniki uzyskane w wyniku realizacji badań są fascynujące. Jednoznacznie pokazano, że to nadprodukcja białka ewoluującego wolno ma silniejszy efekt negatywny na tempo wzrostu drożdży. Uzyskany wynik zaprzecza hipotezie mówiącej, że wolne tempo ewolucji tych białek ma zapobiegać ich toksyczności w warunkach nadprodukcji. Pokazuje również, że białka ewoluujące szybko nie są, tak jak się spodziewano, bardziej toksyczne w warunkach ich nadprodukcji. Drugi ciekawy wynik to obserwacja, że nadprodukcja białek o większej masie cząsteczkowej silniej hamuje tempo wzrostu drożdży. Należy również nadmienić, że w pracy potwierdzono obserwację, że tempo ewolucji białek zależy od poziomu ich ekspresji. Wykazano również negatywny związek pomiędzy tempem wzrostu a dystansem ewolucyjnym w obrębie par paralogów. Czyli wraz ze wzrostem dystansu geny wolniej ewoluujące wykazują większy efekt szkodliwy na tempo wzrostu. Pokazano również, stosując bezpośrednią konkurencję pomiędzy szczepami nadprodukującymi pary paralogów, że konkurencję wygrywiają szczepy nadprodukujące szybko ewoluującego paraloga i że efekt ten jest proporcjonalny do dystansu ewolucyjnego pomiędzy paralogami. Czyli, że geny ewoluujące wolniej są bardziej szkodliwe w warunkach nadprodukcji. Analizowano również jak właściwości fizyko-chemiczne oraz biologiczne białek, opisane za pomocą różnych parametrów obliczanych lub pobranych z baz danych, wpływają na poziom ich ekspresji w warunkach doświadczalnych opisanych w tej pracy. Wykazano, że masa cząsteczkowa białka wpływa negatywnie na jego poziom zrealizowanej ekspresji a wśród cech biologicznych takim czynnikiem jest udział białka w procesie translacji i strukturze rybosomu. Podsumowując wysoko oceniam sposób interpretacji wyników i pomysłowość doktorantki w poszukiwaniu czynników, które mogłyby tłumaczyć obserwowane zależności.

Słabe strony: Istotnym czynnikiem wpływającym na tempo ewolucji sekwencji białka jest jego struktura. Temu zagadnieniu nie poświęcono w pracy zbyt wiele uwagi. To jest okazja do zadania pytania: Jak struktura białka może wpływać na tempo ewolucji jego sekwencji? Czy można zdefiniować parametry strukturalne w taki sposób, że możliwa byłaby analiza statystyczna wpływu tego czynnika na tempo ewolucji? Ponieważ powiązanie właściwości strukturalnych białka z tempem jego ewolucji nie jest proste- brak dyskusji tego problemu w rozprawie nie wpływa na moją wysoką ocenę interpretacji uzyskanych wyników. Zasygnalizowanie tego problemu ma na celu poszerzenie dyskusji w ramach publicznej obrony.

Układ pracy:

Mocne strony: Od początku czytałem tę pracę z wielkim zainteresowaniem. Streszczenie dobrze opisuje problem i sposób jego rozwiązania oraz czytelnie podsumowuje otrzymane wyniki. Wstęp zawiera informacje niezbędne dla zrozumienia przyjętej strategii badawczej. Opisano w nim zarówno organizm modelowy jak też ewolucję białek na drodze duplikacji genu, która prowadzi do powstania paralogów. Wiele miejsca poświęcono kosztom syntezy i utrzymywania białek w komórce. W oddzielnych rozdziałach omówiono proces degradacji białek i ich nadprodukcję. Wreszcie bardzo obszernie przedstawiono hipotezy tłumaczące różnice w tempie ewolucji polipeptydów. Ten rozdział był dla mnie szczególnie interesujący, gdyż prowadzę badania nad paralogami mitochondrialnego białka Hsp70 różniącymi się zarówno funkcją jak też poziomem ekspresji i tempem ewolucji. Moim zdaniem ten rozdział jest dobrym podsumowaniem współczesnych hipotez na temat przyczyn zmienności tempa ewolucji białek. Materiały i metody napisane są bardzo starannie i przejrzysto. Zawierają wszystkie informacje niezbędne dla zrozumienia strategii badawczej. Wyniki podzielono na rozdziały opisujące poszczególne doświadczenia oraz próby korelacji różnych właściwości

białek z wynikami doświadczeń. Każdy taki rozdział zaczyna się od pytania, potem przedstawiane są wyniki lub założenia analizy a następnie ich interpretacja. W dyskusji wrócono do hipotez dotyczących tempa ewolucji białek przedstawionych we wstępie konfrontując je z wynikami uzyskanymi w tej pracy. To pozwoliło zweryfikować hipotezy dotyczące tempa ewolucji białek w kontekście uzyskanych wyników. W spisie cytowanych publikacji (223 pozycje) znalazłem wszystkie znane mi prace poświęcone zagadnieniu tempa ewolucji białek i wiele więcej. Rozprawę kończy obszerny suplement zawierający graficzną prezentację wyników, które w tekście głównym podsumowano za pomocą tabel i schematów. Zawiera on również laboratoryjne opisy poszczególnych procedur badawczych. To ostatnie bardzo mi się podoba. Podsumowując układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera wszystkie niezbędne elementy i jest poszerzony o dodatkowe informacje wyczerpujące wszystkie zagadnienia opisywane w rozprawie.

Słabe strony:

Zastanawiam się czy praca nie byłaby prostsza do czytania, gdyby we wstępie przedstawiono tylko wybrane hipotezy dotyczące tempa ewolucji białek. Te, które były bezpośrednią inspiracją do podjęcia badań doświadczalnych. A nie wszystkie, które omawiane są w dyskusji. Cel pracy powinien być skrócony do jednego zdania- kolejne streszczanie zaburza ciągłość tekstu. W wynikach opisy rysunków są zbyt lakoniczne. Dobrą zasadą jest, gdy można śledzić wywód autora oglądając rysunki i czytając podpisy bez konieczności sięgania do tekstu. W przypadku rysunków przedstawiających wyniki, których interpretacja nie jest prosta bez bardzo uważnego przyglądania się rysunkowi np. Ryc. 6 i Ryc. 7 przydałaby się pomoc graficzna, która ułatwiałaby rozpoznanie głównych trendów. Pytanie do doktorantki: Czy mogłaby Pani w czasie obrony przedstawić powyższe ryciny w bardziej czytelnej formie? Dyskusja jest trochę chaotyczna. Dobrą zasadą jest rozpoczęcie dyskusji od wyników uzyskanych w pracy a dopiero później omawianie ich na tle danych literaturowych. Spodziewałem się, że na początku dyskusji przeczytam krytyczną analizę głównych wyników oraz faktu, że są one sprzeczne z powszechnie znaną hipotezą. Dopiero potem chciałem się dowiedzieć, jak mają się one do innych hipotez znanych z literatury. Nie każda z tych hipotez jest równo cenna i w równym stopniu oparta na solidnych podstawach doświadczalnych i teoretycznych. To trochę umyka w dyskusji. Podsumowując: dobre strony układu pracy zdecydowanie przeważają. Układ pracy oceniam jako adekwatny do prezentowanych wyników.

Język i terminologia

Mocne strony: Pracę czyta się bardzo dobrze. Styl pracy bardzo mi się podoba- jest prosty i logiczny. Praca napisana jest w języku polskim- co może wydawać się prostsze. Trzeba jednak podkreślić, że w języku polskim nie istnieje ustalona terminologia, którą można bezpośrednio stosować do opisu wszystkich wyników badań biochemicznych i ewolucyjnych prezentowanych w rozprawie. To zmusiło autorkę do wypracowania własnej terminologii. Na ogół z sukcesem.

Słabe strony:

W kilku przypadkach natknąłem się na niezręczności językowe:

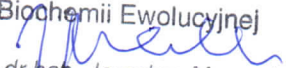
str. 31 ...obfitość białek... nie jestem przekonany, że to najlepszy termin na określenie wysokiego stężenia lub wysokiego poziomu białka w komórce- ale może to nie jest zły termin- proszę o kilka słów na ten temat w czasie obrony publicznej.

str. 33 ...wprowadzono do dobrze poznanego tła genetycznego... powinno być wprowadzono do szczepu, którego tło genetyczne jest dobrze poznane

str. 48 ...o negatywnym efekcie, badanych czynników na obniżenie tempa wzrostu przy nadekspresji... bardzo skomplikowane podwójne przeczenie!
str. 49 Czynniki dodatkowe miały średnio wyraźny wpływ negatywny na MGR, ale generalnie nie zmieniały rankingu (względnej wielkości) poszczególnych indywidualnych efektów nadekspresji.- nie zrozumiałem o co chodzi?
str. 69 ...ograniczeń konstrukcyjnych... chyba chodzi o ograniczenia strukturalne
str 70 ...wpływ układu kodonów... chyba wpływ wykorzystania kodonów
str. 71 ...w dobrym środowisku... chyba w optymalnych warunkach wzrostu...
W kontekście całego tekstu tych niezręczności nie było wiele.

Podsumowanie:

Recenzowaną pracę oceniam bardzo wysoko. Doktorantka zastosowała współczesne metody doświadczalne i analityczne, aby odpowiedzieć na klasyczne pytanie ewolucji molekularnej. Dzięki rygorowi intelektualnemu stawianych pytań, staranności przeprowadzonych doświadczeń oraz ich rzetelnej analizie uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do wiedzy na temat biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za zmienne tempo ewolucji genów kodujących białka. Jestem przekonany, że publikacje przygotowane w wyniku realizacji tych badań będą rozpoznawane i dobrze cytowane. Doktorantka wniosła więc oryginalny i ważny wkład do wiedzy biologicznej co jest warunkiem niezbędnym do uzyskania stopnia naukowego doktora. Wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o umożliwienie mgr **Magdalenie Karolinie Biesiadeckiej** przystąpienia do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie za względu na dużą wartość naukową otrzymanych wyników i rzetelne opracowanie rozprawy doktorskiej wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Kierownik Pracowni
Biochemii Ewolucyjnej

prof. dr hab. Jarosław Marszałek

