



Wrocław, 12.08.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Jana Jakuba Pomorskiego pt. *"Molekularna charakterystyka oksydazy cytochromowej 1 (COI) oraz jej wkład w bioenergetyczną adaptację organizmu do środowiska."*

Zmniejszenie kosztów odczytywania sekwencji kwasów nukleinowych i rozwój technik sekwencjonowania nowej generacji doprowadziły do intensywnego napływu sekwencji DNA wielu organizmów w bazach danych. Uzyskane sekwencje znalazły zastosowanie m. in. w rozpoznawaniu i klasyfikowaniu organizmów oraz odtwarzaniu ich historii ewolucyjnej. W celu zbiektywizowania i zautomatyzowania tego typu analiz zaproponowano wprowadzenie standardowych sekwencji DNA, tzw. kodu paskowego (ang. DNA barcoding), który pozwalałby na jednoznaczną identyfikację gatunku. Takie sekwencje powinny charakteryzować się konserwatywnością w obrębie gatunku i dużą zmiennością pomiędzy gatunkami. Powinny być również łatwe w namnażaniu i oflankowane w miarę konserwatywnymi sekwencjami umożliwiającymi zaprojektowanie uniwersalnych starterów do ich amplifikacji. W przypadku zwierząt za taką sekwencję wybrano fragment mitochondrialnego genu pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (COI).

Mimo powszechnego stosowania tego markera molekularnego w barkodingu DNA, wiele aspektów użyteczności tej sekwencji jest nieprzebadanych. Dlatego przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgra Jana Jakuba Pomorskiego stało się przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań związanych z użytecznością tego markera molekularnego w taksonomii. Kompleksowo zbadano zmienność poszczególnych pozycji w kodonie i ich kombinacji oraz domen i miejsc funkcjonalnych enzymu na różnych poziomach taksonomicznych. Ponadto

powiązано te zmiany ze strukturą trzeciorzędową kodowanego białka i bioenergetyczną adaptacją organizmów do środowiska.

Recenzowana praca ma typowy układ i obejmuje: Streszczenie po polsku, abstrakt po angielsku, Wstęp z celami pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Literaturę oraz załączniki w wersji drukowanej i elektronicznej. Streszczenie i abstrakt są jasno napisane i zawierają postawiony cel i właściwie wybrane najważniejsze wyniki uzyskane w pracy.

Wstęp jest przejrzysty i wystarczający do wprowadzenia czytelnika do omawianych wyników oraz uzasadnienia tez pracy doktorskiej. Doktorant wykazał się dużą wiedzą oraz umiejętnie wybrał i opisał różnorodne zagadnienia wiążące się z tematem pracy doktorskiej dobierając właściwie cytowane prace. We Wstępie scharakteryzowano rolę molekularną oksydazy cytochromowej w aspekcie innych elementów łańcucha oddechowego. Opisano budowę podjednostkową tego enzymu i dokładniej scharakteryzowano strukturę domenową i miejsca funkcjonalne podjednostki I będącej przedmiotem rozprawy. Przedstawiono również oksydazę cytochromową z punktu widzenia bioenergetycznego, występowanie jej izoform o różnej aktywności oraz związek funkcjonowania łańcucha oddechowego i oksydazy cytochromowej u różnych organizmów z warunkami środowiskowymi. Opisano również genom mitochondrialny u różnych organizmów i tempo jego mutacji oraz ideę barkodingu i zastosowanie genu oksydazy cytochromowej I do identyfikacji organizmów. Wspomniano również o wadach tej metody, co świadczy o obiektywizmie i rzetelności doktoranta.

Na str. 8 wypadałoby jednak jawnie podać nazwę przedstawionej reakcji oraz zacytować prace związane z barkodingiem. Na Ryc. 2 błona mitochondrialna jest zaznaczona czarnymi prostokątami jak domeny transbłonowe, co jest mylące zwłaszcza, że łuki symbolizujące domeny międzybłonowe są skierowane w kierunku tych prostokątów. Przed opisami miejsc funkcjonalnych, np. *hem* lub *kanał protonowy*, powinno być *reszty łączące się z hemem* lub *tworzące kanał protonowy*. Na Ryc. 3 dobrze byłoby oznaczyć też inne podjednostki oksydazy. Część dotycząca genomu mitochondrialnego według mnie powinna stanowić równorzędną część do pozostałych, a nie być podrozdziałem części II. Bioenergetyka i adaptacja

organizmów do środowiska. Na początku można by jawnie napisać, że gen oksydazy cytochromowej I jest kodowany w genomie mitochondrialnym, aby zrobić wprowadzenie do części poświęconej temu genomowi. W tej części znalazło się zdanie, że genom mitochondrialny jest cząsteczką DNA występującą nie tylko w mitochondriach komórek organizmów eukariotycznych, ale również u bakterii. Nie wiem, co doktorant miał tutaj na myśli, bo bakterie nie mają mitochondriów. Podane pasożyty *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* i *Trichomonas vaginalis* nie są prokariotyczne, jak jest napisane, ale eukariotyczne.

Cele są jasno sformułowane i wszystkie zostały zrealizowane w ramach pracy doktorskiej. Opisane w rozdziale Materiały i Metody zbiory danych i metodyka badawcza wskazują na dużą wiedzę doktoranta i właściwe przemyślenie sposobu rozwiązania założonych celów badawczych. Doktorant starannie dobrał różne zbiory danych i zastosował właściwe oprogramowanie. Dokładnie opisano i uzasadniono poszczególne etapy analiz dystrybucji zmienności sekwencji, struktur trójwymiarowych i właściwości fizykochemicznych oksydazy cytochromowej. W skrócie scharakteryzowano zastosowane programy i uzasadniono ich użycie.

Sadzę, że dla czytelności można było uwzględnić tabelkę, w której wypisane byłyby zastosowane programy wraz z numerami wersji i adresami ich stron internetowych oraz zastosowanym celem. Prosiłbym również doktoranta o wyjaśnienie jak wygląda ocena jakości sekwencji w bazie BOLD, o czym wspomniał w pracy. Mam również kilka pytań związanych z zastosowaną metodyką. W pracy opisano, że do analiz wybrano po trzy sekwencje reprezentujące dane jednostki taksonomiczne. W jaki sposób były one wybierane? Sposób wyboru może wpłynąć na uzyskane wyniki. Na przykład, wybór bardzo blisko spokrewnionych okazów z tego samego gatunku z tego samego stanowiska może skutkować bardzo małą lub żadną zmiennością w obrębie gatunku, a wybór odległych gatunków danego rodzaju dużą zmiennością wewnątrzrodzajową. Na większości zbiorach sekwencji wyliczano zmienność zwykłą proporcją miejsc, w których badane dwie sekwencje się różnią, a na niektórych zastosowano model Kimury. Prosiłbym o uzasadnienie zastosowania tych metod. Jak na wyniki wpłynęłoby zastosowanie innych

modeli podstawień? Domeny transbłonowe były poszukiwane programem TMHMM. W celu upewnienia się o poprawności otrzymanych przewidywań porównano je z danymi dostępnymi w bazie UniProt. Nie uważam, że jest to dobra weryfikacja, bo jak sam doktorant zauważa adnotowane domeny były też przewidywane komputerowo, może też przy pomocy takiego samego programu. Lepszą kontrolą byłoby sprawdzenie czy uzyskane domeny pokrywały się z regionami znalezionymi eksperymentalnie dla *Bos taurus* i *Paracoccus denitrificans*. Chciałbym również uzyskać informację po co analizowano rozkład danych i stosowano test Shapiro-Wilka. W jakim celu sprawdzano normalność rozkładu danych? Nie zostało to wyjaśnione w pracy. Nie wyjaśniono dlaczego w celu określenia czy pierwsza podjednostka oksydazy cytochromowej wnosi wkład do bioenergetycznej adaptacji organizmów do środowiska porównano nietoperze z drapieżnymi, a nie z inną grupą ssaków. Czy wybór przedstawicieli innego rzędu ssaków wpłynąłby na wynik? Jest wiele programów tworzących struktury trójwymiarowe białek przy pomocy modelowania homologicznego. Dlaczego wybrano akurat I-Tasser?

Rozdział z wynikami jest opisany w sposób zrozumiały i logiczny. Uzasadniono poszczególne etapy analiz. Rzetelnie przeanalizowano zmienność oksydazy cytochromowej na poziomie gatunku, rodzaju i rodziny oraz na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym. Potwierdzono użyteczność fragmentu sekwencji oksydazy do rozpoznawania gatunków. Dzięki analizom zmienności poszczególnych pozycji w kodonie wykazano, że druga pozycja w kodonie (i w konsekwencji sekwencja aminokwasowa) przynajmniej w niektórych taksonach może być zastosowana do przyporządkowania gatunku do rodzaju, co jest jednym z ważniejszych osiągnięć pracy. To rozszerza stosowalność oksydazy cytochromowej I w barkodingu. Interesującym podejściem było przeanalizowanie zmienności nukleotydowej i aminokwasowej w domenach transbłonowych i międzybłonowych oksydazy. Generalnie stwierdzono, że domeny pozabłonowe we fragmencie barkodowym oksydazy są bardziej konserwatywne niż transbłonowe. Wykazano, że u bezkręgowców i kręgowców domeny 5, 12, 15, 19 i 22 cechują się większą konserwatywnością, natomiast domeny 6, 9, 13, 17 i 21 większą zmiennością. Określono także presję selekcyjną wyliczając stosunek podstawień niesynonimicznych do

synonimicznych. Stwierdzono, że był on większy dla domen pozabłonowych niż transbłonowych na poziomie gatunku dla grup kręgowców i Lepidoptera. Odwrotna zależność stwierdzono dla niektórych wyższych jednostek taksonomicznych oraz u Lepidoptera na poziomie rodzaju (Ryc. 7), ale nie znalazłem w wynikach komentarza do tego. Analizy pokazały, że w zależności od badanego taksonu presja selekcyjna jest ukierunkowana na różne domeny, co świadczy o zróżnicowanej ewolucji tego enzymu.

Uważam, że najciekawsze wyniki dotyczą powiązania zmienności oksydazy w odniesieniu do zmian jej struktury przestrzennej i miejsc funkcjonalnych (w tym oddziałujących z innymi podjednostkami) oraz powiązanie tych zmian z różnym poziomem metabolizmu zwierząt. Policzono także energię swobodną Gibbsa w celu określenia stabilności tych struktur. W tym celu doktorant utworzył modele struktur przestrzennych oksydazy dla 15 gatunków zwierząt pochodzących z różnych grup taksonomicznych i bardzo szczegółowo przeanalizował poszczególne pozycje w sekwencjach pod tym względem. Porównanie tych struktur pokazało, że pomimo bardzo dużej zmienności sekwencji aminokwasowych struktura przestrzenna oksydazy jest bardzo konserwatywna, a stwierdzone podstawienia aminokwasowe nie wpływają znacząco na konformację i stabilność oksydazy. Dużą konserwatywność stwierdzono także dla większości miejsc funkcjonalnych, natomiast większym zmianom podlegały miejsca interakcji z innymi podjednostkami u poszczególnych grup zwierząt, co doktorant powiązał z adaptacją organizmów do warunków środowiskowych. Ciekawym wyjątkiem są nicianie, u których znaleziono istotne zmiany we wszystkich miejscach funkcjonalnych z wyjątkiem cząsteczki hemu w centrum bimetalicznym. Zaobserwowano także pewne podstawienia aminokwasowe w kanale protonowym H u niektórych niższych gatunków zwierząt, co może świadczyć o niefunkcjonowaniu tego kanału.

Na str. 38 zastosowano skrót myślowy pisząc, że największe różnice występują między gatunkiem a rodzajem. Chodziło tu o stosunek zmienność międzygatunkowej do wewnątrzgatunkowej oraz międzyrodzajowej do wewnątrzrodzajowej. W Tab. 14 podano wartości podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Nie jestem pewny czy chodziło tu o identyczność (ang.

identity) czy rzeczywiście podobieństwo *sensu stricto* (ang. similarity), które uwzględnia poza identycznymi resztami również reszty podobne fizykochemicznie. Na str. 57 doktorant powołując się na Tab. 15 napisał, że podobieństwo struktury trzeciorzędowej nie zawsze koreluje z podobieństwem sekwencji aminokwasowej COI. Można by to obiektywnie wyrazić przez współczynnik korelacji. W przypadku niektórych naukowych nazw gatunkowych (np. w Tab. 14) można było podać polskie nazwy wyższych jednostek taksonomicznych, np. nicień ssak, ślimak. To by ułatwiło czytanie i analizowanie wyników czytelnikowi. W legendzie do Ryc. 17 dobrze byłoby wyjaśnić co oznacza wstawka. Na str. 67 napisano, że w obrębie pierwszej podjednostki nie ma statystycznie istotnej różnicy pomiędzy zróżnicowaniem sekwencji w miejscach interakcji z innymi podjednostkami a całkowitą sekwencją białka. Dobrze byłoby napisać jaki test zastosowano i dlaczego tylko tutaj.

W rozdziale Dyskusja doktorant przedyskutował rzeczowo najważniejsze osiągnięcia w swojej pracy porównując je z wynikami innych autorów. Dobrze przeprowadzona dyskusja wyników i właściwie wyciągnięte wnioski świadczą o dużej dojrzałości naukowej doktoranta i umiejętności wydobywania najważniejszych informacji z uzyskanych wyników. Za każdym razem doktorant krytycznie i obiektywnie podchodził do uzyskiwanych wyników. Porównał wyniki zmienności całej sekwencji i jej domen z danymi uzyskanymi przez innych autorów, poruszył problem gatunków kryptycznych i siostrzanych w przypadku wysokiej i niskiej zmienności wewnątrzgatunkowej oraz wpływ wielkości próby na otrzymywane wyniki. W dyskusji zmienności w domenach zaproponowano również krótsze odcinki oksydazy cytochromowej I, które mogą być użyteczne w tzw. minibarkodingu. Doktorant znalazł wyjaśnienie większej zmienności domen oksydazy cytochromowej I po stronie matriks mitochondrialnej niż w przestrzeni wewnątrz błonowej. Ma to wynikać z większej liczby podjednostek oksydazy po stronie tej przestrzeni i konserwatywności miejsc kontaktowych podjednostek. Skrupulatnie przedyskutowano zmiany poszczególnych miejsc w sekwencjach uwzględniając właściwości podmienianych reszt aminokwasowych i konsekwencje tych zmian na strukturę i miejsca funkcjonalne. Zaproponowano występowanie zmian

kompensacyjnych i substytucji sprzężonych oraz wpływ różnych izoform na funkcjonowanie całego kompleksu. Doktorant ponadto zasugerował, że zaobserwowane zmiany w wielu miejscach funkcjonalnych u nicieni mogą być związane z ich pasożytniczym trybem życia. Obiektywnie i wyczerpująco przedyskutowano wyniki wiążące zmienność oksydazy z metabolizmem zwierząt opisując substytucje, które mogą być związane z tym zjawiskiem.

Mam drobne uwagi do tej części pracy. Zacytowane liczne wartości zmienności sekwencji dla różnych grup z różnych źródeł można było przedstawić w przejrzystej formie w tabeli, co ułatwiłoby ich porównywanie. Niejasne jest zdanie na str. 82, które zawiera dziwny skrót myślowy: *Istnienie pewnych prawidłowości w sekwencjach, które mogłyby znaleźć swoje odzwierciedlenie w układaniu się sekwencji gatunków w wyższe jednostki taksonomiczne zostało zasygnalizowane w pracach Sirovicha i in. (2009, 2010). Co oznacza układanie się sekwencji gatunków w wyższe jednostki taksonomiczne.* Termin energetyczna niekorzystność na str. 90 jest niefortunny. Na str. 94 wypadałoby zacytować odpowiednią pracę dotyczącą badań funkcji kanału protonowego H z punktu widzenia wprowadzanych mutacji.

Wnioski są przedstawione zwięźle i rzeczowo oraz opisują najważniejsze osiągnięcia rozprawy. Właściwie wyciągnięte wnioski świadczą o zdolności syntetycznego myślenia i dojrzałości naukowej doktoranta. Bibliografia zawiera 285 pozycji głównie anglojęzycznych i najnowszych. Na str. 108 i 115 nie są podane wszystkie dane bibliograficzne, brak numerów czasopisma i stron.

Praca jest napisana poprawnym językiem i stylem, jednak dostrzegłem pewne błędy przedstawionych poniżej wraz z proponowanymi poprawkami: *to test is there* -> *to test if there is* (str. 6); *assembling species* -> *grouping species* (str. 6); *most on the functional sites* -> *most of the functional sites* (str. 6); *heme* -> *hem* (na Ryc. 2); *położona jest z pewnej odległości* -> *położona jest w pewnej odległości* (str. 9); *anotacji* -> *adnotacji* (str. 14); *u których jest brak genu* -> *które nie posiadają genu* (str. 14); *korale* -> *korallowce* (str. 14); *poszczególne geny mogą znajdować się w różnych miejscach genomu* -> *poszczególne geny mogą znajdować się w różnych miejscach genomu u różnych organizmów* (str. 15); *Obecnie COI to białko, którego gen został zsekwencjonowany prawdopodobnie u największej liczby*

gatunków. -> COI to białko, którego gen został zsekwencjonowany jak dotychczas u największej liczby gatunków. (str. 17); stanowonogi -> stawonogi (str. 17); liczba gatunków -> liczba znanych gatunków (str. 17); połowy gatunków -> połowy opisanych gatunków (str. 17); liczba mutacji -> odpowiednia liczba mutacji (str. 19); nie posiadające -> nieposiadające (str. 19); W obecnych czasach, kiedy koszt analizy DNA ciągle spada, zsekwencjonowanie fragmentu genu COI jest jednym z najprostszych badań. -> W obecnych czasach, kiedy koszt sekwencjonowania DNA ciągle spada, analizy fragmentu genu COI są jednym z lepszych sposobów rozwiązywania problemów taksonomicznych. (str. 19); Przeprowadzono oddzielne obliczenia były dla pierwszej -> Przeprowadzono oddzielne obliczenia dla pierwszej (str. 21); z pośród -> spośród (str. 41); zmienność aminokwasowi -> zmienność aminokwasowa (str. 49); jak jedne -> jako jedne (str. 59); mogą tworzą się -> mogą tworzyć się (str. 70); składanie się do środka struktury tych aminokwasów -> umieszczanie się tych aminokwasów w środku struktury białka (str. 70/71); pracach przeprowadzonych na ptakach -> pracach dotyczących ptaków (str. 81); praca taksonów -> praca taksonomów (str. 83); materiału kopalnianego -> materiału kopalnego (str. 84); wartości dla presji selekcyjnej -> wartości dN/dS (str. 85); nie występujących -> niewystępujących (str. 89); strukturę alfy-helisy -> strukturę alfy-helisy (str. 90); .. -. (str. 100). Znalazłem kilka błędów interpunkcyjnych (str. 8, 12, 13, 27, 28, 29, 52, 53, 70, 81, 94, 100). W całej pracy stosowany jest skrót ds z małą literą s dla oznaczenia liczby podstawień synonimicznych. Powszechniej jest stosowany skrót z dużą literą S.

Tekst nie wszędzie jest tak samo wyjustowany. Większość wykresów słupkowych i diagram tortowy (Ryc. 4) powinny być przedstawiane do publikacji naukowych jako płaskie, a nie przestrzenne, ponieważ te ostatnie zniekształcają skalę i trudniej na nich odczytać wartości. Dobrze byłoby ujednotwić typy wykresów, wtedy łatwiej by się je porównywało. Na Ryc. 8 pojawiły się problemy legendą.

Stwierdzone przeze mnie zastrzeżenia nie rzutują jednak na bardzo pozytywną ocenę pracy, a przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wartości ocenianej rozprawy. Reasumując chciałbym stwierdzić, że

recenzowana praca stanowi istotny wkład w metodykę taksonomii molekularnej i barkodingu DNA oraz ewolucję białek na przykładzie podjednostki I oksydazy cytochromowej. Przeprowadzone badania były bardzo zasadne, ponieważ istnieje potrzeba usystematyzowania wiedzy na temat tego powszechnie stosowanego markera molekularnego. Należy podkreślić, że analizy zostały przeprowadzone na szeroką skalę i podejmują wiele wątków badawczych.

Uważam, więc, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy o Stopniach Naukowych. Zgłaszam, zatem wniosek do Rady Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk o uznanie rozprawy Pana mgra Jana Jakuba Pomorskiego za odpowiadającej wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Paweł Mackiewicz

