

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Konrada Deleńko
pt. "Charakterystyka metabolizmu RNA podczas odróżnicowania
komórek mezofilowych *Arabidopsis thaliana*."**

Opis ogólny

Rozprawa doktorska Pana mgr Konrada Deleńko ma formę monografii i posiada układ dla tej formy prac doktorskich. Rozprawa składa się z ośmiu rozdziałów ('Wykazu używanych skrótów', 'Streszczenia', streszczenia w języku angielskim, 'Wstępu', 'Materiałów i metod', 'Materiałów i metod suplementu', 'Wyników', 'Dyskusji', 'Wniosków' i 'Literatury', część z nich została podzielona dodatkowo na podrozdziały.

Rozprawa liczy 158 stron tekstu, zawiera 6 rycin, 13 wykresów oraz 12 planszy ze zdjęciami. W pracy znajduje się 9 tabel. W rozprawie doktorant zamieścił, także wykaz publikacji oraz wystąpień zjazdowych, w których prezentowane były wyniki doktoratu. W pracy zacytowano imponującą liczbę pozycji literatury naukowej, bibliografia liczy aż 347 pozycji. Rozprawa została napisana klarownym, poprawnym językiem. Do pracy dołączono także płytę CD z dodatkowymi danymi.

W pierwszej części rozprawy doktorant wyczerpująco omówił dwa zasadnicze problemy badawcze; ekspresję genów w komórkach eukariotycznych oraz udział miRNA w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Omówione zostały także zagadnienia związane z dedyferencjacją komórek oraz ich totipotencjalnością. Oceniając dysertację należy zwrócić szczególną uwagę na wagę wybranego zagadnienia. Temat dysertacji jest niezwykle interesujący nie tylko w zakresie badań podstawowych ale także aplikacyjnych.

Dla cytologa komórki roślinnej, niezwykle interesujące są zmiany zachodzące w protoplaście. Usunięcie ściany komórkowej wiąże się nie tylko z brakiem zewnętrznego szkieletu komórki ale, także z „dramatycznym” zerwaniem łączności symplastowej, reorganizacją cytoszkieletu oraz kortykalnego retikulum endoplazmatycznego. Protoplasty oraz zjawisko odróżnicowania się komórek roślinnych wykorzystywane są m.in. w otrzymywaniu mieszańców międzygatunkowych czy międzyrodzajowych oraz nowych odmian, a także propagacji rzadkich,

ginących gatunków.

W kontekście człowieka, temat odróżnicowania komórek jest interesujący w związku z leczeniem chorób neurodegeneracyjnych, udarów czy też uszkodzeń rdzenia kręgowego.

Nawet około 30% genów z ludzkiego genomu podlega regulacji przez miRNA. Poziomy ekspresji mikroRNA są skorelowane z cechami histopatologicznymi niektórych ludzkich nowotworów m.in. zdolnością do przerzutów, wielkością guzów oraz ich unaczynieniem. Znanych jest ponad 200 specyficznych miRNA dla ludzkich tkanek i nowotworów. Dlatego też miRNA mają ogromny potencjał w diagnostyce i prognostyce nowotworów. Jednocześnie inhibicja specyficznych miRNA może prowadzić do aktywacji kaspaz i docelowo apoptozy komórek nowotworowych, stąd badania miRNA mogą się także przysłużyć w terapii antynowotworowej.

Ocena merytoryczna

W ocenie rozprawy naukowej najważniejszy jest oryginalny problem naukowy oraz jak problem ten został rozwiązany. Głównymi celami w recenzowanej rozprawie, było:

1. Zbadanie poziomu aktywności transkrypcyjnej genomu ze szczególnym uwzględnieniem transkrypcji prowadzonej przez polimerazę II RNA
2. Poznanie przestrzennej organizacji ekspresji genów w 7 stadiach m.in. w komórkach mezofilu, protoplastach w trakcie odróżnicowania oraz dzielących się komórkach.
3. Określenie roli PTGR z udziałem miRNA w procesie odróżnicowania.

By rozwiązać wspomniane problemy badawcze Pan Konrada Deleńko posłużył się szeregiem technik biologii komórki wykonując następujące zadania badawcze. Doktorant określił poziom aktywnej transkrypcyjnie polimerazy II RNA. Zbadał poziom i lokalizację poli(A) RNA, 25S rRNA oraz dystrybucję snRNA i SC35. Przeanalizował przeżywalność protoplastów mutantu *dcl1-9*. Określił poziom i dystrybucję białka AGO1 oraz ilość i lokalizację D-bodies w jądrach komórkowych. Doktorant przeprowadził także analizę frakcji miRNA pochodzącej z komórek liści oraz z komórek ulegających odróżnicowaniu.

Warto zaznaczyć, iż doktorant przetestował aż 5 metod izolacji i hodowli protoplastów mezofilowych *Arabidopsis thaliana*, w tym doktorant opracował własną oryginalną metodę. Bardzo mocną stroną pracy jest część metodyczna; zarówno praca z RNA jak i hybrydyzacja *in situ* oraz reakcje immunolokalizacyjne (w tym podwójne znakowania) wymagały dużej staranności i wysiłku. Część dokumentacyjna dysertacji cechuje się wysoką jakością, co jest standardem w pracach wykonywanych w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

Uważam, że doktorant w pełni rozwiązał oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawił.

Najważniejsze osiągnięcia

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawionej pracy doktorskiej uznaję:

- Wykazanie, że izolacja protoplastów (stres związany z utratą ściany komórkowej) powoduje 8,5-krotny spadek intensywności transkrypcji prowadzonej przez polimerazę II RNA. Zjawisko to prawdopodobnie ma związek z wyłączeniem ekspresji genów mezofilowych i nabywaniem przez protoplasty totipotencji.
- Wykazanie iż nie zawsze stopień kondensacji chromatyny jest skorelowany z jej aktywnością, a jej fizyczna dekondukcja nie jest w stanie zainicjować transkrypcji.
- Stwierdzenie, że podczas odróżnicowania dochodzi do tzw. „czyszczenia cytoplazmy” polegającego na intensywnym usuwaniu transkryptów 25S rRNA i poli(A) RNA z cytoplazmy.
- Wykazanie, że regulacja ekspresji genów z udziałem miRNA jest niezbędna podczas odróżnicowania jak i w okresie podziałów komórkowych.
- Stwierdzenie ważnej roli miR319 i miR396 w regulacji pierwszych podziałów komórek podczas odróżnicowania.
- Wykazanie istotnego znaczenia stresu oksydacyjnego (miR398), szlaków sygnałowych z udziałem auksyn (miR390a i miR390b) oraz mechanizmów utrzymujących totipotencję (miR396a-3p i miR194) w procesach odróżnicowania.
- Wykazanie, roli genów *MIR319*, *MIR390*, *MIR398* w procesie odróżnicowania komórek roślinnych.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań:

Doktorant stwierdził że nie zawsze stopień kondensacji chromatyny jest skorelowany z jej aktywnością, a jej fizyczna dekondukcja nie jest w stanie zainicjować transkrypcji. Czy z literatury znane są podobne wyniki otrzymane np. na modelu zwierzęcym?

Jakie są przykłady transportu symplastowego miRNA pomiędzy różnymi typami komórek roślinnych?

Czy siRNA pełnią rolę w odróżnicowaniu komórek roślinnych? Różnice w działaniu siRNA a miRNA.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja doktorska mgra Konrada Deleńko spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, poz. 455, Dz. U. z 2011 r. Nr 84, Dz. U. z 2014 r. poz. 1198) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki poziom przedstawionej dysertacji wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału o nagrodzenie Pana mgra Konrada Deleńko.