

Dr hab. Hanna Fabczak prof. nadzw.

Zakład Biologii Komórki

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Łabuz zatytułowanej:

**„Ścieżka przekazu sygnału świetlnego sterującego ruchami chloroplastów
Arabidopsis thaliana i ich funkcjonowanie w różnych warunkach środowiska”**

Trudno sobie wyobrazić życie na ziemi bez roślin, byłoby ono po prostu niemożliwe. Dzięki fotosyntezie, rośliny dostarczają tlen do atmosfery. Zawdzięczamy to znajdującym się w komórce roślinnej chloroplastom, gdzie przy wykorzystaniu energii słonecznej z dwutlenku węgla i wody powstają cukry i produkt uboczny, tlen. Rośliny, w przeciwieństwie do zwierząt, nie mogą zmieniać swojego położenia, więc musiały one wykształcić określone sposoby pozwalające komórce roślinnej kontrolować i regulować odpowiedź chloroplastów na zmienne warunki środowiska takie jak zbyt intensywne oświetlenie, długotrwały cień lub zmiany temperatury. Ruch kierunkowy chloroplastów, które wybierają optymalne warunki oświetlenia opisano już na początku zeszłego wieku. Obecnie wiadomo, że za ten ruch odpowiedzialne jest światło niebieskie, które pobudza wyspecjalizowane receptory, fototropiny, znajdujące się pod błoną komórkową. Poznano także system ruchowy, białka zaangażowane w kierunkowe przemieszczanie się chloroplastów. Nie wiemy jednak lub wiemy stosunkowo mało w jaki sposób sygnał przekazywany jest z fototropin do układu motorycznego chloroplastów. Próba poszerzenia wiedzy w tym zakresie jest tematem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Łabuz.

Opis formalny rozprawy

Rozprawa, mieszcząca się na 125 stronach maszynopisu, napisana jest w układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Wstęp, który poprzedza streszczenie, zajmuje 36 stron i jest przeglądem dotychczas dostępnych informacji o ruchach chloroplastów. W tej części zawarta jest również charakterystyka białek odpowiedzialnych za przemieszczanie tych

organelli. Omówiono w nim także układ fotoreceptorowy roślin, zwracając szczególną uwagę na fototropiny. Po tym wprowadzeniu Autorka przechodzi do zasadniczego tematu jakim jest omówienie roli wtórnych przekaźników, wapnia i fosfatydyloinozytoli, w kontroli ruchów chloroplastów. W kolejnym rozdziale są precyzyjnie przedstawione cele pracy. W trzech następnych - umieszczono opis wykorzystanych Materiałów i Metod badawczych, uzyskanych Wyników oraz ich Dyskusję. Ostatnimi fragmentami rozprawy są Podsumowanie, Dodatek z uzupełniającymi informacjami dotyczącymi materiałów i metod oraz szczegółowe zestawienie cytowanej literatury zawierające 196 pozycji, z czego blisko 45% stanowią publikacje z ostatnich 5 lat.

Ocena merytoryczna rozprawy

Procesy odpowiedzialne za indukowane światłem niebieskim kierunkowe przemieszczanie chloroplastów w komórkach roślinnych są tematem badawczym zespołu kierowanego przez prof. Halinę Gabryś od wielu lat. Wyjaśnienie mechanizmów przekazywania sygnałów w roślinach jest zadaniem niezwykle ważnym. Sygnały te decydują nie tylko o wzroście i rozwoju roślin ale także o ich odporności na stresy środowiskowe, mogą zatem decydować o produktywności roślin. Dlatego badania prowadzone przez prof. Gabryś i jej współpracowników są nie tylko ważne z punktu widzenia czysto poznawczego, ale również praktycznego.

Rozprawa doktorska mgr Justyny Łabuz poświęcona jest wyjaśnieniu początkowej fazy przekazu bodźca świetlnego, od wzbudzonych fototropin do układu ruchowego chloroplastów. Jednym z zadań jakie postawiła przed sobą Autorka była odpowiedź na pytanie jak wybrane czynniki środowiskowe, takie jak światło i temperatura, wpływają na układ fotoreceptorowy. W drugiej części pracy Autorka podjęła próbę określenia funkcji wtórnych przekaźników, jonów wapnia i fosfatydyloinozytoli w kontroli ruchu chloroplastów. Aby te cele osiągnąć Doktorantka wyznaczyła sobie kilka zadań częściowych, a mianowicie:

- 1) zbadanie wpływu światła na ekspresję fototropiny 1 i fototropiny 2 na poziomie mRNA w czasie rozwoju i starzenia się roślin,
- 2) scharakteryzowanie wpływu warunków świetlnych hodowli na ekspresję fototropin na poziomie mRNA i białka,
- 3) określenie wpływu temperatury na ekspresję fototropiny 1 i fototropiny 2 na poziomie mRNA i białka oraz reakcje ruchowe chloroplastów kontrolowane przez te receptory,

4) wyjaśnienie roli fosfatydyloinozytoli w ruchu chloroplastów poprzez charakterystykę przebiegu odpowiedzi chloroplastów w mutantach fototropinowych na działanie inhibitorów szlaku inozytolowego, wortmaniny i LY294002,

5) zbadanie udziału jonów wapnia w kontroli ruchów chloroplastów poprzez charakterystykę translokacji Ca^{2+} metodą mikroanalizy rentgenowskiej w roślinach typu dzikiego i mutantach fototropinowych naświetlanych światłem niebieskim i czerwonym.

W badaniach Doktorantka wykorzystała modelowy organizm jakim jest rzodkiewnik pospolity, *Arabidopsis thaliana*. Do realizacji postawionych zadań użyła Ona bogatego zestawu narzędzi współczesnej biologii molekularnej, biochemii, fotobiologii oraz nowoczesnej techniki mikroskopii elektronowej. Pani Justyna Łabuz okazała się bardzo dobrym eksperymentatorem swobodnie korzystającym z możliwości dostarczonych przez te techniki badawcze i sprawnie posługującym się warsztatem analizy statystycznej.

Doktorantka precyzyjnie realizowała postawione sobie cele. Rozpoczęła od sprawdzenia jak światło wpływa na poziom ekspresji transkryptów fototropiny 1 i fototropiny 2 w czasie rozwoju i starzenia. Wykazała, że za wyjątkiem jednodniowych siewek, w czasie rozwoju roślin światło nieznacznie obniża poziom transkryptu fototropiny 1 w przeciwieństwie do transkryptu fototropiny 2, dla której obserwowano indukowany światłem wzrost mRNA. Podobny charakter zmian stwierdzono podczas starzenia się liści. Interesujących wyników dostarczyły badania mające na celu ustalenie wpływu zmiennych warunków oświetlenia w trakcie hodowli na poziomy mRNA i białka dla obu fotoreceptorów. Podczas gdy ilość białka i mRNA fototropiny 2 zmieniały się nieznacznie, to w przypadku fototropiny 1 obserwowano prawie dwukrotny spadek poziomu białka w roślinach rosnących w słabym i silnym świetle w porównaniu do warunków standardowych przy stałym poziomie transkryptu. Doktorantka również wykazała, spowodowane zmianami temperatury, różnice w poziomach ekspresji mRNA i białka badanych fotoreceptorów. Obserwacje te korelują ze zmianą przebiegu reakcji ruchowych chloroplastów. Stwierdzono, że w niskich temperaturach reakcja ucieczki chloroplastów jest silnie stymulowana przy natężeniach światła nie wysycających, w standardowej temperaturze pomiaru, co wskazuje na dominującą rolę fototropiny 2 w kontroli tych procesów. W serii doświadczeń poświęconej badaniu udziału fosfatydyloinozytoli w przebiegu reakcji chloroplastów wykorzystano rośliny typu dzikiego oraz mutanty niezdolne do ekspresji fototropiny 1 lub fototropiny 2 jak również obu fototropin. W oparciu o obserwacje parametrów reakcji ruchowych chloroplastów Autorka uznała, że kinazy 3 i 4 fosfatydyloinozytoli kontrolują przebieg procesu akumulacji podczas, gdy reakcja ucieczki prawdopodobnie jest regulowana zmianami stężenia jonów wapnia w wyniku aktywacji

szlaku fosfatydyloinozytoli . Ten ostatni wniosek stał się przesłanką do przeprowadzenia analizy rozmieszczenia jonów wapnia w komórkach mezofitu poddanych działaniu światła o różnej długości fali. W tym celu zastosowano technikę precypitacji jonów wapnia piroantymonianem i analizę z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wyposażonego w przystawkę do rentgenowskiej mikroanalizy jonowej. Zaobserwowano zwiększenie zawartości jonów wapnia w precypitatach zlokalizowanych w komórkach typu dzikiego stymulowanych światłem niebieskim w porównaniu do mutantów i komórek stymulowanych światłem czerwonym. Doświadczenia w tej części pracy Autorka wykonała w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nenckiego.

Chcę podkreślić, że tekst rozprawy czyta się znakomicie i tak też praca powinna być oceniona. Ponadto, jej lektura pobudza do myślenia, a zwłaszcza w przypadkach, gdy prezentowane wyniki, choć bardzo ciekawe pozostają nie do końca jednoznaczne i wymagają jeszcze dalszych badań.

Dyskusja przedstawianych zagadnień literaturowych

Wstęp

W tym rozdziale omówienie zagadnień dotyczących tematyki rozprawy doktorskiej Pani Justyny Łabuz jest poprowadzone w sposób logiczny i wyczerpujący. Jedynie na str. 25, Rozdział 1.2.3, Autorka kończy rozważania nad odmienną rolą fototropiny 1 i fototropiny 2 w kontrolowaniu ruchów chloroplastów stwierdzeniem, że „Nie można jednakże wykluczyć, że to asymetryczne ułożenie fotoreceptorów w komórce determinuje kierunek reakcji”. Mimo poszukiwań nie znalazłam w tekście wyjaśnienia na czym polega asymetryczne ułożenie tych fotoreceptorów. Jediną informację jaką znalazłam, to że oba białka ułożone są podbłonowo.

Opis metod

Do zestawienia i opisu stosowanych metod w pracy nie mam większych zastrzeżeń. Tylko w dwóch przypadkach będę wdzięczna za wyjaśnienie jak dbano o rośliny, aby nie uległy stresowi poddane długotrwałemu naświetlaniu silnym światłem przez 2 tygodnie (str. 38). Sam zastosowany bodziec był czynnikiem stresogennym. Sądzę ponadto, że wszystkim hodowłom poświęcano dużo uwagi i troski.

I druga niejasna dla mnie sprawa: czy był jakiś specjalny powód aby błony nitrocelulozowe po inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym płukać w roztworze blokującym, jak podaje Autorka na str. 43 tego rozdziału. Zazwyczaj używa się roztworu

TBS lub PBS z dodatkiem Tweenu, tak jak w przypadku odpłukiwania przeciwciał drugorzędowych.

Wyniki i Dyskusja

Autorka rozpoczyna dyskusję stwierdzeniem, że „prezentowane zestawienie ekspresji fototropin na poziomie mRNA pod wpływem światła w czasie wzrostu i starzenia się *Arabidopsis thaliana* jest najbardziej systematyczne i kompletne z dostępnych obecnie w literaturze”. Z pewnością ta uwaga nie jest gołosłowna, gdyż wyniki te zostały opublikowane w *J. Exp. Botany* prestiżowym czasopiśmie, którego IF w 2011 r. przekroczył wartość 5. Jednak Doktorantka w dalszej części dyskusji bardzo słusznie zauważa, że obserwowane zmiany transkryptu *PHOT1* powinny być raczej przypisane regulacji ilości samego białka, a nie kodującego go mRNA. Dotyczy to z pewnością również drugiego fotoreceptora. To ostrożne podejście do prezentowanych wyników znalazło swoje uzasadnienie w „niekompatybilności” poziomu mRNA i białka obu fototropin, zwłaszcza w przypadku roślin hodowanych w zmiennych warunkach otoczenia (Rozdziały 4.1.3 i 4.2.1). Tu nasuwa się pytanie jak pokazane zmiany poziomu mRNA w pierwszej części pracy mają się do poziomu białka fototropiny1 i fototropiny2. Czy takie doświadczenia, mające na celu określenie ilości fototropin na poziomie białka są planowane, a być może są już w toku?

Kontynuując, w dalszej części dyskusji Autorka zauważa, że w dojrzałych liściach *Arabidopsis thaliana*, naświetlanie przez 3 godziny światłem białym o natężeniu $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ powoduje spadek ilości białka fototropiny 1 podobnie jak transkryptu, jednak nie wpływa na poziom białka fototropiny 2, mimo że reguluje jej ekspresję na poziomie mRNA (Ryc. 4.12). I tu cytat; „Tak więc wzrost transkryptu PHOT2 nie zawsze musi korelować ze wzrostem ilości białka, co czyni interpretację powyższych wyników jeszcze bardziej skomplikowaną”. W tym konkretnym doświadczeniu może należało rozważyć czynnik czasowy. Próby do analizy poziomu transkryptu i białka były pobierane w tym samym czasie, tj. po 3 godzinach naświetlania. Być może synteza białka fototropiny 2 była opóźniona w stosunku do transkrypcji tego fotoreceptora. Dodatkowy pomiar poziomu białka w późniejszym czasie może ułatwić interpretację tych wyników.

Badając wpływ warunków świetlnych (Rozdział 4.1.3) i temperatury (Rozdział 4.2.1) na poziom ekspresji fototropin Pani Justyna Łabuz przeprowadziła pomiar zmian ilości mRNA oraz porównywała poziom fototropiny 1 i fototropiny 2 metodą western blottingu. Wyniki z tej ostatniej metody zostały przedstawione w postaci diagramu po analizie densytometrycznej.

Wydaje się wskazanym aby zamieścić w tym miejscu także przykładowe immunobloty tak jak to zostało zrobione w Rozdziale 4.3.

Terminologia

Doktorantka dobrze posługuje się terminologią biologiczną i biochemiczną. Tym niemniej, Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów, na które pozwalam sobie zwrócić uwagę. W podpisie do Rys. 1.1 Autorka używa określenia włókna aktyny, a właściwym terminem dla struktur aktynowych jest określenie filamenty aktynowe. Także na str. 26 (Rozdział 1.2.3), poprawnym jest stosowanie określenia zachowany w ewolucji zamiast konserwatywny. Na stronach 26 i 27 (Rozdział 1.2.4) określenie cytozol raczej ogranicza się do frakcji cytozolowej, natomiast w komórce mamy do czynienia z cytoplazmą, chociaż wiem, że takie określenie spotyka się w literaturze polskojęzycznej.

W opisie Ryc. 1.5 i 1.6, Autorka używa określenia zasoby jonów wapnia, wewnątrzkomórkowe magazyny jonów wapnia wydaje mi właściwszym sformułowaniem.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

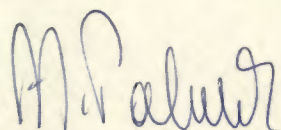
Praca jest przygotowana edytorsko niezwykle starannie, napisana ciekawym, zrozumiałym i poprawnym językiem. Pani Justyna Łabuz poświęciła wiele uwagi na przejrzyste skomponowanie poszczególnych rycin i podpisów pod nimi. Elegancko skomponowane schematy zawarte w rozprawie w bardzo dogodny sposób przybliżają czytelnikowi stosowane procedury i przebieg doświadczeń. Opisy poszczególnych doświadczeń są wyczerpujące i dokładne. W tekście rozprawy znalazłam niewiele literówek, co świadczy o uważnej korekcie pracy

Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na nieznaczne przeoczenia : niewłaściwe cytowanie publikacji Briggs i Sakamoto (2002), które powinno być zacytowane tak jak zapisano w spisie cytowanej literatury Sakamoto i Briggs (2002). I jeszcze kilka nieścisłości, a mianowicie mylnie zacytowano na str. 85 Ryc. 5.1 i 5.2, na Ryc. 4.16 ominięto oznaczenia paneli A, B, C, zaś na Ryc. 4.21 brak jest oznaczeń strzałkami precypitatów wapnia i antymonu na styku chloroplast i wakuola, jak napisano w podpisie do rysunku.

Niezależnie od wymienionych powyżej uwag przedstawioną mi do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Rozwiązanie postawionych zadań osiągnięto na drodze wielu dobrze zaplanowanych i wykonanych doświadczeń popartych odpowiednimi kontrolami. Pani Justyna Łabuz okazała się sprawnym eksperymentatorem, dla którego świat fototropin w zakresie dostępnej wiedzy nie kryje tajemnic. Dyskusja w świetle współczesnej literatury

przeprowadzona jest inteligentnie i wyczerpująco, świadczy o analitycznym i krytycznym podejściu Autorki do uzyskanych wyników. W wielu wypadkach Autorka zaznacza, że prezentowane wyniki wymagają dodatkowych doświadczeń i analiz, bądź ich interpretacja jest trudna, ze względu na sprzeczne lub niepełne dane literaturowe.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Łabuz spełnia w pełni wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Justyny Łabuz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, chciałabym prosić Wysoką Radę, by uwzględniając przebieg obrony, rozważyła możliwość wyróżnienia mgr Justyny Łabuz stosowną nagrodą.



Warszawa, 25 września 2012 r.