

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR OLGII SZTATELMAN ZATYTUŁOWANEJ:

„FOTOTROPINA2 – REGULACJA I FUNKCJA”

Najważniejszą cechą wyróżniającą rośliny wśród innych grup organizmów jest ich zdolność do wykorzystania energii świetlnej do wytworzenia cząsteczek zasobnych w energię, które następnie mogą być spożytkowane jako substancje odżywcze. Jest to osiągane poprzez ewolucyjnie wykształcony zestaw mechanizmów, które są ze sobą ściśle powiązane funkcjonalnie, i które sprzyjają optymalizacji procesu pobierania i przekształcania energii, działając na wszystkich poziomach organizacji biologicznej roślin. Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Olgii Sztatelman są właśnie powiązania funkcjonalne wynikające z działania jednego z fotoreceptorów – fototropiny2 w szlaku/szlakach przekazywania bodźca świetlnego do innych przedziałów komórek roślinnych.

OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Recenzowana praca jest napisana w układzie typowym dla prac doktorskich. Właściwa rozprawa mieści się na 109 stronach maszynopisu. Wstęp, napisany niezwykle przejrzysto i przystępnie, wprowadza Czytelnika w zagadnienia przedstawione w rozprawie. Pokróćce omówiono 1) mechanizmy percepcji światła przez rośliny wyższe, 2) receptory z rodziny fototropin, 3) znaczenie modyfikacji potranslacyjnych w mechanizmach przekazywania sygnałów na przykładzie fototropiny2, a także 4) wybrane zagadnienia dotyczące ruchów chloroplastów. W kolejnej części określono cele pracy. W dwóch następnych rozdziałach opisano wykorzystane materiały i stosowane metody, oraz uzyskane wyniki. Te ostatnie przedyskutowano w kolejnym rozdziale, którego ostatnią częścią jest podsumowanie. Zestawienie cytowanej literatury zamyka właściwą rozprawę. Uzupełnieniem w postaci Dodatku są rozszerzone informacje dotyczące stosowanych linii roślin transgenicznych, szczepów bakteryjnych, starterów oligonukleotydowych i plazmidów oraz wybranych procedur doświadczalnych.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Ruchy chloroplastów, mechanizmy napędzające ruch, znaczenie funkcjonalne ruchów, jak również powiązanie ruchów z mechanizmami detekcji bodźca świetlnego to zagadnienia od lat będące w centrum zainteresowania zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Halinę Gabryś. Jedną z wielu kwestii, nierozwiązanych dotąd w sposób zadowalający, są mechanizmy umożliwiające optymalizację funkcjonowania chloroplastów w różnych warunkach oświetleniowych. Choć katalog białek potencjalnie zaangażowanych w odbiór bodźca świetlnego nie jest zbyt obszerny, to jednak rozwikłanie mechanizmów molekularnych wiążących strukturę tych białek z pełnioną funkcją, a w szczególności przełożenie odbioru bodźca na reakcje organelli, komórek, tkanek i całych roślin, wymaga jeszcze wielu badań szczegółowych. W tym nurcie mieści się recenzowana rozprawa doktorska mgr Sztatelman, poświęcona fototropinie2. Fototropiny zostały zidentyfikowane jako białka receptorowe, wykrywające światło niebieskie i UV-A, które są odpowiedzialne za reakcje ruchowe całych roślin (fototropizm), jak i reakcje ruchowe na niższych poziomach organizacyjnych, takie jak otwieranie aparatów szparkowych czy ustawianie chloroplastów względem padającego światła. W genomie rośliny modelowej, *Arabidopsis thaliana*, kodowane są dwie fototropiny – 1 i 2, które różnią się między sobą stopniem wrażliwości na intensywne i słabe bodźce świetlne. W efekcie obie fototropiny w odmienny sposób kontrolują dwie podstawowe reakcje ruchowe chloroplastów, czyli reakcję ucieczki i reakcję akumulacji.

W rozprawie doktorskiej mgr Sztatelman podjęła się analizy wybranych mechanizmów regulacji oraz funkcji jednego z fotoreceptorów, a mianowicie fototropiny2. Swoje badania przeprowadziła wykorzystując szeroki wachlarz kilkunastu dostępnych mutantów rzodkiewnika. Każdy z analizowanych mechanizmów został zbadany przy użyciu dobrze dobranych podejść doświadczalnych z zakresu biochemii, molekularnej biologii komórki, czy fotobiologii. Muszę przyznać, że bogactwo i różnorodność zastosowanych technik mogą wzbudzić podziw, świadcząc o bardzo dużej sprawności eksperymentalnej Doktorantki.

Pierwszym wątkiem pracy jest analiza porównawcza zmienności ekspresji genów obu fototropin. Chociaż bowiem fototropiny pełnią podobne funkcje, to regulacja przez światło ich zawartości w komórkach jest odmienna. Autorka analizowała zmiany ekspresji genów fototropin na poziomie mRNA z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Chcąc odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób światło wpływa na zmiany ekspresji, analizie poddano rośliny typu dzikiego, mutanty *phot1* i *phot2* oraz mutanty, w których uszkodzone są geny kodujące białka z innych rodzin fotoreceptorów – kryptochromów i fitochromów. Stwierdzono, że ekspresja genów fototropin jest kontrolowana w odmienny sposób. Zawartość mRNA fototropiny1 jest regulowana przez kryptochrom 1 i fitochrom B, natomiast zmiany zawartości mRNA dla fototropiny2 podlegają kontroli prawie wszystkich fotoreceptorów, z dominującą rolą fitochromu A i kryptochromów. Co więcej, wykazano, że fototropiny nie regulują wzajemnie poziomu ekspresji swoich genów, jak również, że intensywność fotosyntezy nie ma wpływu na wywołaną światłem ekspresję genów fototropin.

Najciekawszą, moim zdaniem, część pracy stanowią doświadczenia, w których Doktorantka badała znaczenie modyfikacji potranslacyjnych dla funkcjonowania fototropiny2. Zbadano dwa typy modyfikacji, a mianowicie układ fosforylacji/defosforylacji oraz układ dobudowujący małe białka SUMO. W przypadku fosforylacji/defosforylacji już wcześniej, w innych laboratoriach, dokonano analiz fototropizmu roślin. W rozprawie Autorka podjęła się analizy ruchów chloroplastów w roślinach typu dzikiego i w mutantach, w których były uszkodzone różne elementy układu kontrolującego poziom fosforylacji białek, jak również przeprowadziła cykl doświadczeń farmakologicznych z użyciem inhibitorów fosfataz białkowych – kantarydyny i endotалу. Wykazała, że inhibitory hamują ruchy chloroplastów, jednakże nie udało jej się zidentyfikować konkretnego enzymu odpowiedzialnego za defosforylację białek. W dalszej części, w serii bardzo elegancko zaplanowanych doświadczeń, Doktorantka zajęła się sumoilacją fototropiny2. System sumoilacji został zrekonstruowany w *Escherichia coli*, a analizie poddano różne izoformy białka SUMO, jak również ligazy SUMO występujące u rzodkiewnika. Na podstawie danych bioinformatycznych stwierdzono, że fototropina2 ma kilka potencjalnych miejsc sumoilacji. Wniosek ten potwierdzono doświadczalnie, wskazując, że domeną przede wszystkim ulegającą modyfikacji jest N-końcowy fragment białka. Co niezmiernie ciekawe, w układzie przejściowej ekspresji par genów w komórkach epidermy *Nicotiana benthamiana* Doktorantka udowodniła również, że poszczególne elementy układu sumoilacji oddziałują ze sobą oraz z fototropiną2. Z kolei na podstawie analiz reakcji ruchowych chloroplastów w roślinach mutantach z uszkodzonymi genami poszczególnych elementów układu sumoilacji, mgr Sztatelman stwierdziła, że proces sumoilacji może uczestniczyć w funkcjonowaniu fototropiny2.

Trzecią część rozprawy stanowią wyniki doświadczeń, które miałyby wskazać, jaką rolę fizjologiczną pełni reakcja ucieczki chloroplastów kontrolowana przez fototropinę2. Co mnie szczególnie zaskoczyło w trakcie analizy rozprawy, to konstatacja, że choć intuicyjnie dość łatwo można wskazać kilka potencjalnych ról dla tej reakcji, to w zasadzie żadna z nich nie została dotąd w sposób ostateczny potwierdzona bądź odrzucona. Mgr Sztatelman postanowiła podjąć się weryfikacji hipotezy, która stwierdza, że reakcja ucieczki chloroplastów na silnym świetle pełni rolę fotoprotekcyjną. Podejściem doświadczalnym wykorzystanym w tym przypadku była analiza parametrów fluorescencji chlorofilu i stanu aparatu fotosyntetycznego, dokonywane *in vivo*. Doktorantka opracowała model doświadczalny, w którym światło niebieskie używano do ustawiania chloroplastów, a światło czerwone pełniło rolę czynnika stresowego. Dzięki temu powiązano ruchy chloroplastów z jasną fazą fotosyntezy, a więc rzeczywiście potwierdzono doświadczalnie fotoprotekcyjną rolę przemieszczeń tych organelli.

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ ROZPRAWY

Praca jest przygotowana niezwykle starannie pod względem tekstowym i ilustracyjnym. Moje szczególne uznanie wzbudziła dbałość w stosowaniu poprawnej polszczyzny. Muszę z ogromnym zadowoleniem stwierdzić, że rozprawa jest napisana językiem, którego jakość znacznie przekracza średnią obserwowaną zwykle w pracach doktorskich. Bez przesady będzie stwierdzenie, że rozprawa Pani Sztatelman łąduje na samym szczycie opracowań edytorskich rozpraw dotychczas przeze mnie recenzowanych.

Moje drobne zastrzeżenia, które **nie wymagają dyskusji**, pozwalam sobie zebrać w kilku punktach.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- Objaśniając skrót COP1 przetłumaczono angielską nazwę mutantu – rośliny cechującej się konstytutywną fotomorfogenezą; nie poinformowano jednak, że jest to mutant, ani też, alternatywnie, że jest to nazwa białka. Podobnie postąpiono jeszcze przy kilku innych białkach. Nie jest to błędem, ale mimo wszystko takie objaśnienie skrótu nie niesie pełnej informacji.

WSTĘP

- Przyjmuję, że to zwykła pomyłka. Na str. 24 nieprawidłowo opisano wzajemne ułożenie ścian komórkowych i kierunku padającego światła. Powinno chyba być: „W słabym świetle chloroplasty gromadzą się pod ścianami komórkowymi **prostopadłymi** do kierunku padania światła...”.

WYNIKI

- Trochę żargonowo brzmi sformułowanie „rośliny dzikiego ekotypu”.
- Mały drobiazg techniczny. W moim egzemplarzu zestaw zdjęć z mikroskopu konfokalnego „przesunął się” o jedną stronę. Brakująca strona 59 znalazła się w ten sposób przed stroną 67.

DYSKUSJA

- Białka mają „właściwości” a nie „własności” (str. 83).

ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Rozprawa doktorska jest w pewnym sensie momentem szczególnym w rozwoju naukowym; momentem, w którym po latach działalności analitycznej pojawia się możliwość spojrzenia na swoje badania z pewnej perspektywy i dokonania syntezy. Stąd też, jakość rozprawy i opisanych w niej doświadczeń można oceniać w różny sposób. Z mojego osobistego punktu widzenia mogę powiedzieć, że rozprawę czytałem z dużym zainteresowaniem. Głównie ze względu na postawiony problem biologiczny, ale również dla mnogości podejść doświadczalnych, które zostały w rozprawie wykorzystane. Pewne drobne spostrzeżenia poczynione w trakcie czytania pracy sprawiają, że chciałbym prosić Doktorantkę o chwilę dyskusji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej nad poniższymi zagadnieniami.

- We Wstępie, wprowadzając w zagadnienia odbioru i przekazywania sygnałów świetlnych, Doktorantka na str. 11 używa określenia „wsteczna sygnalizacja” na opisanie sygnałów przekazywanych z chloroplastów do jądra i wpływających na zmiany w transkrypcji. Ponieważ temat ten został potraktowany niezwykle skrótowo, prosiłbym o jego rozszerzenie i przedstawienie odrobiny więcej informacji, zwłaszcza o cząsteczkach sygnałowych.
- Na tej samej stronie zaintrygował mnie opis jednego z mechanizmów regulacyjnych zależnych od fototropiny. Chodzi mianowicie o „spłaszczanie liści”. Podobnie jak powyżej, uprzejmie proszę o rozszerzenie tego opisu w trakcie obrony.
- Pewne zaskoczenie, ale i wątpliwości wzbudziła we mnie informacja, że po wzbudzeniu część cząsteczek fototropiny2 przemieszcza się od błony komórkowej do aparatu Golgiego (Wstęp; str. 16). Trochę kłóci się to z moim rozumieniem kierunków wędrówki białek w układzie wewnątrzkomórkowym. Byłbym wdzięczny za szersze przedstawienie tej sprawy, a zwłaszcza dowodów przemawiających za taką lokalizacją fototropiny2.

- W kontekście informacji przedstawianych we Wstępie, jak również uzyskanych w pracy wyników, prosiłbym Doktorantkę o opinię, który poziom regulujący zawartość fototropin w komórkach roślin uważa Ona za dominujący: kontrolę poziomu mRNA, czy też kontrolę poziomu białka?
- Wszystkie prezentowane w rozprawie wyniki uzyskano stosując rośliny typu dzikiego z ekotypu Columbia 0. Jednak Doktorantka kilkakrotnie wspomina, że przeprowadzała również niektóre doświadczenia z roślinami ekotypu Landsberg erecta. Chciałbym w związku z tym zadać dwa pytania.
 - Z przedstawionych opisów wynika, że trendy zmian u obu ekotypów były podobne. Czy dało się jednak zauważyć jakieś różnice swoiste dla ekotypów?
 - Mogę się jedynie domyślać, że wszystkie stosowane mutanty również uzyskano w podłożu genetycznym ekotypu Columbia 0. Czy znane są Doktorantce odpowiadające sobie (alleliczne?) mutanty fotoreceptorowe, ale umiejscowione w różnych podłożach genetycznych? A jeśli tak, to czy wiadomo coś o potencjalnych różnicach między nimi?
- W opisie rysunku 4.1.1 Autorka stwierdza, że przedstawione dane poziomów mRNA w liściach roślin stanowią średnią z trzech powtórzeń technicznych. Chciałbym wobec tego zapytać, czy były wykonywane powtórzenia biologiczne, a jeśli tak, to jak wyniki z różnych powtórzeń biologicznych miały się do siebie?
- Na str. 55 Doktorantka stwierdza, że „...fototropina2 pełnej długości nie podlega wydajnej ekspresji w komórkach bakterii *Escherichia coli*...”. Ponieważ nie ma żadnego odnośnika literaturowego, chciałbym zapytać, czy stwierdzenie to jest oparte na danych literaturowych, czy też własnych próbach w tym zakresie?
- Na str. 56-57 są zawarte dane dotyczące potencjalnej sumoilacji fototropiny2. Autorka w omówieniu posługuje się opisem wartościującym (np. „niższa intensywność prążków”). Prosiłbym o skomentowanie tego, a w szczególności o informację, czy uzyskane wyniki rzeczywiście zostały oszacowane choćby półilościowo, np. densytometrycznie, czy też jest to raczej jedynie oszacowanie wizualne?
- BiFC. Doktorantka dość dobrze udokumentowała przeprowadzone doświadczenia. Chciałbym jednak poprosić, by w trakcie obrony pokazane zostały zdjęcia różnych kontroli, które są konieczne do weryfikacji doświadczenia. Prosiłbym również o komentarz odnośnie obserwacji, które mamy po doświadczeniach własnych w UAM. Czy Doktorantka obserwowała zmiany lokalizacji lub rozkładu sygnału fluorescencyjnego w zależności od intensywności ekspresji genów niesionych na plazmidach? W szczególności dotyczy to obserwowanego zróżnicowania umiejscowienia jądrowego pojedynczych czy też oddziałujących ze sobą białek (obraz rozproszony lub ziarnistości).
- Pracę zamyka bardzo ładnie napisane Podsumowanie. To, czego mi w nim troszeczkę zabrakło, to „zajrzenia w przyszłość”. Doktorantka co prawda raz czy drugi w pracy wspomina, że pewne zagadnienia wymagają dalszych badań. Chciałbym jednak prosić, by Doktorantka, będąc bogatszą w doświadczenia swojej pracy, pokusiła się o zarysowanie dalszych perspektyw badawczych. W szczególności chciałbym się dowiedzieć, czy Doktorantka przewiduje weryfikację wyników uzyskanych techniką BiFC, na przykład stosując analizy FRET-FLIM?

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest niezwykle ciekawą próbą zmierzenia się z tematem funkcjonowania jednego z fotoreceptorów roślinnych – fototropiny2. Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitne cele poznawcze, a do ich realizacji wykorzystała ogromny wachlarz podejść badawczych w długiej serii bardzo eleganckich, dobrze zaplanowanych i zrealizowanych doświadczeń. W trakcie prac Doktorantka wykazała, że potrafi trafnie operować nagromadzoną wiedzą i opanowanymi narzędziami badawczymi. Z przeprowadzonych badań mgr Sztatelman wyciągnęła poprawne wnioski, jak również wskazała zalety i ograniczenia uzyskanych wyników. Rozprawa została znakomicie opracowana i zredagowana, a znaczna część wyników została już opublikowana w bardzo dobrych

naukowych czasopismach międzynarodowych. Konkludując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Olgi Sztatelman do dalszych etapów przewodu doktorskiego zmierzającego do nadania stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. Równocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo znaczącej części badań chciałbym prosić Wysoką Radę, by, uwzględniając przebieg obrony, rozważyła możliwość wyróżnienia mgr Sztatelman stosowną nagrodą.

P. Wołoszek

Poznań, 5 listopada 2012 r.