



UNIwersytet WarsZawski  
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

WYDZIAŁ BIOLOGII  
ul. MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA  
TEL: (+22) 5543916, FAX: (+22) 5543910



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.

„Oxidative stress and changes in thylakoid membrane fluidity during barley leaf senescence,  
(Stres oksydacyjny i zmiany płynności błon tylakoidowych podczas starzenia się liści jęczmienia)  
wykonanej przez Pana mgr Ivana Jajica w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału  
Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Strzałki.

### 1. Uwagi ogólne

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy zagadnienia związanego ze starzeniem się liści jęczmienia i jest próbą wyjaśniania mechanizmów indukujących zmiany płynności błon tylakoidowych i rolę reaktywnych form tlenu (RFT) w tym procesie. Celem pracy było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie: jakie zmiany organizacyjne/funkcjonalne zachodzą w błonach tylakoidowych podczas zmian ich właściwości fizycznych indukowanych starzeniem.

Tematyka rozprawy stanowi kontynuację badań prowadzonych z powodzeniem od wielu lat pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Strzałki.

Starzenie jest ostatnim etapem w cyklu życiowym rośliny. Proces ten zachodzi na wszystkich poziomach organizacji począwszy od komórek, tkanek, poprzez organy do całych roślin. Biologiczna rola starzenia polega na zależnej od wieku programowanej degradacji i degeneracji organizmu prowadząc do jego śmierci.

Liście mogą wkraczać w fazę starzenia po osiągnięciu określonego wieku poprzez zmiany stężenia metabolitów i/ oraz regulatorów wzrostu. Starzenie może być również indukowane poprzez generowanie stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na abiotyczne i biotyczne sygnały środowiskowe tj. susza, nadmiar światła, deficyt substancji mineralnych, promieniowanie UV-B itp. Ogólnie wiadomo, że starzeniu się liści towarzyszy dramatyczna zmiana w metabolizmie komórkowym i degradacja struktur, w pierwszym rzędzie chloroplastów. Bardzo drastycznie obniża się również zawartość białek enzymatycznych związanych z fazą ciemną fotosyntezy. Stwierdzono, że równolegle z obniżeniem zawartości białek spada ekspresja genów kodujących te białka, obserwuje się aktywację transkrypcji genów

niektórych proteaz oraz genów kodujących enzymy zaangażowane w usuwaniu reaktywnych form tlenu powstających podczas degradacji błon. Potwierdza to tezę, że starzenie jest procesem kontrolowanym genetycznie i wymaga ekspresji nowych, specyficznych genów. Nie wiadomo jednak, jakiej natury jest sygnał decydujący o tym, i które z białek są degradowane w pierwszej kolejności. Żółknięcie liści jest znanym objawem starzenia. Zanikowi białek towarzyszy bowiem stopniowa degradacja chlorofilu i rozkład karotenoidów oraz dezintegracja systemu tylakoidowego. Prowadzi to początkowo do obniżenia, a następnie do zahamowania aktywności fotosyntetycznej liści. Nie ulega więc wątpliwości, że procesy zachodzące podczas starzenia się liści podlegają ścisłej kontroli genetycznej. Jest wiele pytań pozostających bez odpowiedzi, które dotyczą starzenia. Nie jest znane np. jakie sygnały rozwojowe rozpoczynają proces starzenia i śmierci, i jakie jest molekularne podłoże tego procesu. Wiadomo również, że istnieją ściśle powiązania metaboliczne pomiędzy chloroplastami i mitochondriami. Należy więc oczekiwać, że związek ten powinien być szczególnie dobrze widoczny w końcowym okresie życia rośliny kiedy aktywność fotosyntetyczna jest bardzo niska. Czynniki indukujące starzenie powodują zmiany w obrębie błon polegające na zwiększeniu ich przepuszczalności na skutek peroksydacji lipidów, co jest związane z generowaniem RFT. Są sporadyczne, niepełne informacje mówiące o związku starzenia się liści ze zmianami płynności błon tylakoidowych roślin. Badania nad wykazaniem pierwotnego miejsca zmian podczas starzenia liści oraz towarzyszących temu procesów są ciągle aktualnym problemem badawczym. Poznanie jak zmiany fizyczne błon tylakoidowych wpływają na zawartość białek błonowych i barwinków fotosyntetycznych i w jakiej relacji pozostają do RFT otwierają nowe możliwości badań nad ich rolą w adaptacji i aklimatyzacji roślin do zmiennych warunków środowiskowych jak i poznania molekularnej bazy starzenia roślin.

W recenzowanej rozprawie doktorskiej znalazły się wyniki badań nad właściwościami błon tylakoidowych jęczmienia podczas starzenia naturalnego i indukowanego ciemnością oraz badano reakcje odpowiedzialne za produkując RFT. Różnorodne metody biofizyczne stosowane w pracy pozwoliły na wykonanie wielu pomiarów *in vitro*, co było niezwykle istotne ze względu na badane mechanizmy.

W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej p. I. Jajica jest ważny, naukowo aktualny i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Podjęcie tego tematu przez doktoranta można uznać więc za uzasadnione, zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i ewentualnej implikacji ich wykorzystania w podniesieniu wydajności fotosyntetycznej roślin.

Pod względem formalnym praca jest skonstruowana poprawnie.

## 2. Uwagi formalne

Recenzent rozprawy mgr Jajica ma ułatwione zadanie, ponieważ duża część uzyskanych przez Niego wyników jest przedmiotem publikacji. Praca doktorska mgr Jajica stanowi zbiór trzech spójnych tematycznie prac (dwie prace oryginalne i jeden artykuł przeglądowy) opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach. We wszystkich pracach mgr Jajica jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jego znaczący udział w prowadzonych badaniach.

Dwie prace oryginalne, zostały opublikowane w r. 2014 w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Journal of Plant Physiology*. Na uwagę zasługuje również uczestnictwo doktoranta jako współautora w artykule przeglądowym opublikowanym w r. 2015 w czasopiśmie *Plants*. Do prac dołączono również streszczenie w języku polskim (2 strony) oraz opis uzyskanych wyników (w języku angielskim, zawarty na 9 stronach maszynopisu) na tle danych literaturowych (spis literatury zawiera 47 prac bardzo dobrze wybranych).

Dane eksperymentalne wchodzące w skład rozprawy doktoranta zostały już poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów wymienionych publikacji.

Artykuł przeglądowy pt. "Senescence, stress and reactive oxygen species.", (*Plants* 2015, 4, 393-411) jest wstępem do dwóch prac oryginalnych zawierających główne osiągnięcia doktoranta. Stanowi on bardzo dobry przegląd opublikowanych wyników badań dotyczących wielu aspektów powstawania reaktywnych form tlenu, ich charakterystyki i metod detekcji z uwzględnieniem roli RFT podczas starzenia i w warunkach działania stresu środowiskowego. Przedstawia on aktualny stan wiedzy na temat strukturalnych i molekularnych zmian indukowanych RFT. Stanowi bardzo dobre wprowadzenie dla sformułowania założeń i celu pracy.

Trudno polemizować z wynikami prac doktoranta już opublikowanymi, można jedynie podkreślić wagę uzyskanych wyników.

Doktorant badał właściwości fizyczne błon tylakoidowych liści jęczmienia przy pomocy techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) podczas zarówno naturalnego jak i indukowanego 5 dniowym okresem ciemności starzenia,. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy pt. „EPR spin labelling measurements of thylakoids membrane fluidity during barley leaf senescence” (*JPP* (2015) 171, 1046-1053). Prowadzone badania wykazały, że podczas starzenia liści zwiększa się płynność błon tylakoidowych i procesowi

temu towarzyszy wzrost dyfuzji tlenu przez błony oraz następuje obniżenie w nich zawartości białek i karotenoidów.

Najbardziej interesującym wynikiem tej pracy jest wykazanie spadku zawartości ksantofili (i brak zeaksantyny) podczas starzenia, co może prowadzić do zwiększenia produkcji RFT i stresu oksydacyjnego. Jednocześnie, obserwowany znaczny wzrost zawartości  $\beta$ -karotenu w błonach i zwiększenie dyfuzji tlenu może powodować ich uszkodzenie.

Wykazano, że skład lipidowy błon tylakoidowych wpływa na stabilność i integrację struktur białkowych. Ponadto badania pokazały, że płynność błon tylakoidów, jest ważnym fizykochemicznym czynnikiem decydującym o indukcji starzenia liści zależnym od składu i ilościowego stosunku karotenoidów do białek i może być istotnie modyfikowana przez skład jakościowy karotenoidów. Nie bez znaczenia pozostaje także udział karotenoidów w ochronie antyoksydacyjnej. Zastosowanie nowych technik pomiarowych oraz zwiększenie czułości detekcyjnej istniejących metod fizykochemicznych pozwoliło na lepsze poznawanie mechanizmów na poziomie molekularnym odpowiedzialnych za etap starzenia w rozwoju rośliny oraz jego indukcję przez stres środowiskowy.

Praca pt. „Changes in production of reactive oxygen species in illuminated thylakoids isolated during development and senescence of barley” (JPP, 2014, 184, 49-56) stanowi kontynuację prowadzonych konsekwentnie badań i dotyczy powstawania RFT: nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), tlenu singletowego ( $^1O_2$ ) i rodnika ponadlenkowego ( $O^{2-}$ ) podczas starzenia liści. Wykazano, że podczas starzenia zmienia się zawartość  $H_2O_2$  i  $O^{2-}$  i zachodzi peroksydacja lipidów błonowych, natomiast zawartość  $^1O_2$  pozostaje na stałym niskim poziomie. Wyniki te w powiązaniu z wcześniej opisanymi pokazują, że zmiana płynności błon tylakoidowych prowadzi do lepszej dyfuzji tlenu przez błony, powstawania RFT i peroksydacji lipidów. Otrzymane wyniki pokazują jednoznacznie, że zmiany w zawartości RFT w błonach podczas rozwoju i starzenia liści mogą odgrywać ważną rolę w sygnalizacji komórkowej. Wydaje się również, że zmiany płynności błon mogą być markerem procesu starzenia.

Przedstawione wyniki badań zostały już ocenione przez recenzentów, są opublikowane i wnoszą nowe dane do nauki.

Drobne uwagi:

W przedstawionym streszczeniu znalazłam drobne usterki:

Rys. 1 w legendzie do rysunku są inne oznaczenia niż przedstawione na rysunku, nie rozwinięto też stosowanych skrótów

Na Rys. 2 nie przedstawiono wyników statystycznie

Rys. 3 brak legendy do przedstawionych diagramów

Rys.4 szkoda, że wartość MDA wyrażono w nmol/ml a nie np. nmol/gśm, trudno bowiem porównać tak przedstawione wyniki

W podsumowaniu wyników zabrakło mi przedstawienia własnej koncepcji doktoranta dotyczącej drogi sygnałowej w roślinie podczas starzenia.

Odczuwa się też brak w pracy wyników badań *in vivo* (np. fluorescencyjnych) dobrze ilustrujących postępujące starzenie liści. Zabrakło mi również porównania starzenia naturalnego z indukowanym ciemnością. Wymienione usterki nie umniejszają wartości naukowej pracy i pozostają bez wpływu na jej ocenę, są dyskusyjne.

### 3. Uwagi końcowe

Wymienione wyżej uwagi dotyczące merytorycznych walorów ocenianej pracy doktorskiej przedstawionej w postaci trzech opublikowanych prac wraz z komentarzem, pokazują, że praca ma charakter oryginalnej pracy naukowej i spełnia wszelkie wymogi stawiane dysertacji doktorskiej. Praca ta wniosła nowe dane do nauki dotyczące roli płynności błon, zawartości karotenoidów i RFT w indukcji starzenia liści roślin. Rozprawa świadczy o dobrym przygotowaniu mgr Ivana Jajica do samodzielnej pracy badawczej, o umiejętności postawienia hipotezy roboczej, opanowaniu różnorodnych metod badawczych, skutecznym i konsekwentnym prowadzeniu badań, o dobrej znajomości piśmiennictwa i umiejętności krytycznej dyskusji własnych wyników w jego kontekście.

Przedstawiona rozprawa odpowiada ustawowym warunkom stawianym pracom doktorskim, przeto stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr Ivana Jajica do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

17.10.2015

prof. dr hab. Elżbieta Romanowska

**KIEROWNIK**  
ZAKŁADU MOLEKULARNEJ FIZJOLOGII ROŚLIN  
INSTYTUTU BOTANIKI  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
prof. dr hab. Elżbieta Romanowska

