ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 12 czerwca 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Jedynaka pt. „Rola białka COP1 w regulacji biosyntezy chlorofilu i karotenoidów w *Arabidopsis thaliana*"

Bez nadmiernej przesady, zaryzykować możemy stwierdzenie, że zielona barwa chlorofili oraz żółto-pomarańczowa barwa karotenoidów stanowią nie tylko tło życia na naszej Planecie ale, przede wszystkim, istnienie życia warunkują. Wspomniane barwniki należą bowiem do klasy pigmentów fotosyntetycznych odpowiedzialnych za pochłanianie energii promieniowania słonecznego, która następnie, właśnie w procesie fotosyntezy, ulega konwersji do energii zmagazynowanej w wiązaniach chemicznych, mogącej być wykorzystaną do zasilania reakcji leżących u podstaw procesów życiowych. Rozprawa doktorska pana mgr. Pawła Jedynaka związana jest z badaniami regulacji biosyntezy chlorofilu i karotenoidów w roślinach, dotyczy więc bezpośrednio tych ważnych zagadnień. Fakt, iż prowadzone w ramach projektu doktorskiego badania ukierunkowane były na poznanie roli jednego z ważniejszych białek związanych z biogenezą chloroplastów, białka COP1, czyni prezentowaną rozprawę nie tylko interesującą ale również ważną z poznawczego punktu widzenia.

Praca doktorska mgr. Pawła Jedynaka wykonana została pod kierunkiem dr. hab. Przemysława Malca., w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biochemii, Biofizyki

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl

i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w renomowanym ośrodku zaangażowanym w zaawansowane badania w obszarze biochemii, biofizyki oraz bioenergetyki procesu fotosyntezy. Rozprawa stanowi stosunkowo obszerne i wszechstronne opracowanie. Zredagowana została w języku polskim, na 173 stronach standardowego maszynopisu, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Pracę otwiera stosunkowo rozbudowane i szczegółowe streszczenie, które ze względu na walory redakcyjne pełni już niejako formę wprowadzenia w podejmowaną w ramach badań tematykę. Wymaganiom formalnym zadość czyni zamieszczona dodatkowo anglojęzyczna forma streszczenia. Jeszcze przed spisem treści zamieszczony został wykaz skrótów, tyleż obszerny co potrzebny, a nawet niezbędny przy dalszej lekturze rozprawy, szczególnie w jej fragmentach dotyczących aspektów genetycznych. Bardzo cenię sobie wysoki poziom merytoryczny oraz wartość dydaktyczną doskonale zredagowanego rozdziału pierwszego, zatytułowanego „Wstęp". W ramach rozdziału tego Autor przedstawia w sposób systematyczny, w oparciu o przejrzyste i przemyślane grafiki oraz zdjęcia, problemy ogólne związane z fotomorfogenezą roślin oraz szczegółowe dotyczące białka COP1 i kompleksu sygnałowego COP9. Poczesne miejsce wśród treści wprowadzających w tematykę badań zajmują zagadnienia dotyczące biosyntezy barwników chlorofilowych oraz karotenoidowych. Strategiczny cel pracy doktorskiej, związany z poznaniem roli oraz mechanizmów na drodze których białko COP1 oraz kompleks sygnałowy COP9 uczestniczą w regulacji biosyntezy barwników fotosyntetycznych, sformułowany został w ramach rozdziału drugiego o nazwie „Cel pracy". Rozdział ten prezentuje również szereg szczegółowych zadań poznawczych, prowadzących do realizacji celu zasadniczego. Część eksperymentalną rozprawy otwiera prezentacja użytych materiałów, wykorzystanych procedur doświadczalnych oraz zastosowanych technik instrumentalnych, w ramach rozdziału trzeciego pt. „Materiały i metody". Rozdział ten zredagowany został ze znaczną troską poświęconą precyzji oraz klarowności opisów, co w zasadzie, umożliwia przeprowadzenie analogicznych eksperymentów przez zainteresowanych badaczy. W tym miejscu swojej analizy chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na bogactwo zastosowanych podejść metodologicznych, mające wyraz w projektowaniu zadań badawczych w oparciu o różnorodne, komplementarne techniki oraz metody pomiarowe. Na przykład, przy analizach poziomu barwników oraz białek czy też markerów stresu oksydacyjnego. Struktura kolejnego rozdziału, zatytułowanego „Wyniki", odpowiada sekwencji zadań

badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego. W ramach projektu tego prowadzono różnorakie analizy porównawcze etiolowanych oraz poddanych de-etiolacji siewek rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, typu dzikiego oraz przemyślnie wyselekcjonowanych mutantów *cop/det/fus*. Uzyskane rezultaty poddane zostały wieloaspektowej a zarazem bardzo szczegółowej dyskusji w ramach rozdziału piątego pt. „Dyskusja". Ostatnia sekcja tego rozdziału (podrozdział o numerze 5.5) zawiera podsumowanie, eleganckie w swojej formie oraz zilustrowane plastycznymi schematami, wyjątkowo starannie przygotowanymi, zarówno w aspekcie treści merytorycznych jak i jakości warsztatu graficznego. Dodatkowo, zasadnicze wnioski wypływające z uzyskanych wyników, wypunktowane zostały w formie zestawienia stanowiącego półstronicowy rozdział zatytułowany „Wnioski". Rozprawę zamyka wykaz cytowanego piśmiennictwa, prezentowany w ramach rozdziału siódmego „Literatura", oraz bogaty zestaw informacji uzupełniających, prezentowany w ramach rozdziału ósmego pt. „Dodatek".

W pełni podzielam zdanie Doktoranta co do wskazania najważniejszych osiągnięć rozprawy, wyartykułowanych w ramach rozdziału szóstego. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na zasadniczą rolę białka COP1 oraz kompleksu sygnałowego COP9 w regulacji biosyntezy chlorofilu oraz karotenoidów oraz pośrednio w odpowiedzi na poziomie fizjologicznym na stres oksydacyjny pojawiający się szczególnie na etapie de-etiolacji siewek roślin.

Na podkreślenie zasługuje również wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorowi nieliczne korekty. Oto ich krótka lista:

1. Natężenie światła podawane jest w obrębie całej rozprawy w jednostkach gęstości strumienia fotonów, czyli µmol fotonów $m^{-2}s^{-1}$, wobec tego proponowałbym podawanie tej wielkości zamiast „mocy strumienia świetlnego",
2. Str. 33., 20. wiersz od dołu, „Millipore" w miejsce „Milipore",
3. Str. 33, 19. wiersz od dołu, jednostką oporności właściwej jest „MΩ*cm" nie zaś „MΩ*cm^{-1}",
4. Str. 42., Tab. 3.1, zeaksantyna występuje w tabeli dwukrotnie,
5. Str. 104., 7. wiersz od dołu, „niezależnie" w miejsce „niezzależnie",

6. Str. 108., 12. wiersz od góry, proponuję „Czas życia fluorescencji protochlorofilidu" zamiast „Czas życia protochlorofilidu",
7. Str. 126., 8. Wiersz od góry, „reguluje akumulację" w miejsce „reguluje akumulacji".

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pana mgr. Pawła Jedynaka, dostarcza wielu cennych i nowych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące problemy:

1. Zgodnie z legendą do Rys. 4.2 (str. 51), jeden z bardziej intensywnych pików odzwierciedlających profil elucyjny HPLC analizowanych barwników w ekstraktach z etiolowanych siewek, odpowiadających czasowi retencji bliskiemu 6 min., odpowiada wiolaksantynie w konfiguracji molekularnej *cis*. Tym czasem, z analizy przedstawionej w ramach Rys. 4.3 (str. 52) wynika, iż w większych stężeniach występuje wiolaksantyna całkowicie *trans*. Który z przedstawionych wyników odzwierciedla stan faktyczny? Ciekaw jestem również, który z izomerów *cis* pojawia się w puli wyekstrachowanej wiolaksantyny, centralny (np. 15-15'-*cis*) czy raczej jeden z peryferyjnych (np. 9-*cis*)?

2. Z uzyskanych w ramach rozprawy wyników wynika jednoznacznie, iż aktywność białka COP1 wpływa na obniżenie poziomu ekspresji enzymu epoksydazy zeaksantynowej. Z drugiej strony, z analizy składu barwnikowego ekstraktów z siewek wynika, iż praktycznie cała pula barwników cyklu ksantofilowego pojawia się w formie wiolaksantyny nie zaś zeaksantyny. Ciekaw jestem jakie mogłoby być wyjaśnienie tego paradoksu.

3. Niezmiernie interesujący wynik uzyskany w ramach rozprawy wiąże się, moim zdaniem, z udziałem białka COP1 w selektywnym hamowaniu biosyntezy chlorofilu *b*. Ciekaw jestem czy taki fenomen może mieć związek z faktem, iż wydajność przejść międzysystemowych prowadzących do powstawania stanów tripletowych, a więc

pośrednio zdolność do fotouczulanej generacji tlenu singletowego i destrukcji oksydacyjnej, jest istotnie wyższa w przypadku chlorofilu *b* w porównaniu z chlorofilem *a*.

4. Zgodnie z wynikami ogłoszonymi przez E. Pfundela i R.J. Strassera w 1988 r. (Photosynth. Res. 15: 67-73) etiolowane liście posiadają w pełni funkcjonalną deepoksydazę wiolaksantynową, która może być aktywowana, na przykład, na drodze obniżenia pH poprzez infiltrację roztworu kwasu askorbinowego. Ciekaw jestem czy zeaksantyna powstała w ten sposób mogłaby obniżyć poziom generacji tlenu singletowego (np. monitorowanego z zastosowaniem znacznika SOSGR) oraz poziom degradacji oksydacyjnej lipidów (np. monitorowanej z zastosowaniem testu TBARS). Czy różnice we wpływie zeaksantyny na te procesy mogłoby pomóc w uzyskaniu informacji odnośnie lokalizacji enzymów oraz barwników cyklu ksantofilowego w chloroplastach, na różnych etapach ich biogenezy?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Paweł Jedynak przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Jestem przekonany, iż rezultaty te mogą stać się podstawą interesujących publikacji w czasopismach o szerokim zasięgu, wnosząc istotny postęp w obszarze badania aspektów biofizycznych procesu fotosyntezy, w szczególności mechanizmów fotoprotekcyjnych osłaniających aparat fotosyntetyczny roślin przed destrukcją na wczesnych etapach jego formowania.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Pawła Jedynaka spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Gratulując Doktorantowi tak cennych i licznych rezultatów uprzejmie proszę o przyjęcie mojej rekomendacji oraz wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana mgr. Pawła Jedynaka do dalszych etapów postepowania doktorskiego.