Prof. dr hab. Zbigniew Miszalski
Instytut Fizjologii Roślin PAN
Kraków

Kraków, 12.06.2018

R E C E N Z J A

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

Rozprawa doktorska mgra Pawła Jedynaka koncentruje się na charakterystyce białek odpowiedzialnych za regulację biosyntezy chlorofilu i karotenoidów w siewkach modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*. Często obserwowany przez nas proces etiolacji i de-etiolacji u roślin okrytozalążkowych przyciągał od szeregu lat uwagę wielu naukowców, jednak wiele zależności umożliwiających dogłębne zrozumienie tego zjawiska pozostaje nieprzebadane. Jak dotychczas zainteresowania badaczy reprezentujących nauki fizjologiczno-biochemiczno-genetyczne często koncentrowały się na opisie roli poszczególnych genów, białek i procesów uczestniczących w procesie etiolacji i de-etiolacji, ale rola poszczególnych białek odpowiedzialnych za skoto- i fotomorfogenezę nie jest wyjaśniona, a fakt powiązania tych procesów z tzw. stresem oksydacyjnym był często zaniedbywany. Praca doktorska jest kontynuacją prac prowadzonych pod kierunkiem prof. Przemysława Malca i Doktorant korzystał z doświadczeń Zespołu. Przedstawione w niniejszej pracy eksperymenty mają przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale uzyskane wyniki mogą wyjaśniać wiele już poczynionych obserwacji i stanowić drogowskaz dla działań praktycznych.

Oceniana obszerna praca obejmująca 173 strony wraz z tzw. „dodatkiem", 24 tabele, 58 rycin, zawiera elementy typowe dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych.

Wstęp stanowi obszerną część rozprawy i donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. Autor charakteryzuje w bardzo generalnym ujęciu obecny stan wiedzy dotyczącej tematu, a wiadomości zaczerpnięte są z publikacji z ostatnich 20 lat. W pierwszych podrozdziałach scharakteryzowano ogólnie mechanizmy odpowiedzialne za kształtowanie procesów skoto- i fotomorfogenezy, a w szczególności kompleks białek COP/DET/FUS, które są negatywnymi regulatorami fotomorfogenezy. W kolejnych podrozdziałach w dość wyczerpujący sposób zestawiono dane dotyczące zjawisk zachodzących w trakcie przechodzenia od etiolacji do de-etiolacji, koncentrując uwagę na białku COP1, które jest kluczowym w tej fazie rozwoju rośliny. W tym fragmencie

Doktorant skupił się w dużej mierze na mechanice procesów dotyczących wybranych białek. Fragment *Wstępu* poświęcił roli kompleksu sygnałowego COP9 regulujących różnorodne procesy, odwołując się także do literatury uzyskanej w badaniach nad organizmami zwierzęcymi. W kolejnych podrozdziałach opisał zagadnienie biosyntezy i degradacji barwników chlorofilowych i karotenoidów. *Wstęp* jest wyposażony w przejrzyste schematy jak i tabelaryczne ujęcie danych biograficznych. Z zestawionych we *Wstępie* informacji wynika wprost jak wiele znamy szczegółów i jak niewiele rozumiemy z problematyki związanej z pełnioną przez poszczególne białka rolą w komórkach, a także z zagadnień dotyczących regulacji ich ekspresji. Jako najważniejszy wytyczony cel rozprawy doktorskiej Doktorant postawił określenie poziomu poszczególnych barwników fotosyntetycznych i ich prekursorów, identyfikację krytycznych genów odpowiedzialnych za poziom barwników i stwierdzenia powiązań z regulacją poziomu reaktywnych form tlenu. Zaproponował też podstawowe warunki doświadczeń w celu uzyskania możliwie jednoznacznej odpowiedzi na postawione pytania.

Podsumowując ten fragment pracy można stwierdzić, że we *Wstępie* Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością szerokiego fragmentu literatury i podjął próbę usystematyzowania wiedzy dotyczącej regulacji skoto- i fotomorfogenezy oraz zaproponował graficzne przedstawienie kluczowych mechanizmów i najważniejszych metabolitów. Omawiany rozdział został przedstawiony logicznie i w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. W mojej opinii rozdział ten mógłby być cennym fragmentem opracowania przeglądowego. Doktorant wykazał się umiejętnością dostrzeżenia aktualnych, a niezbadanych obszarów naszej wiedzy i określenia problemu badawczego. Pomimo wypunktowanych zalet mam jednak małe zastrzeżenie. Dlaczego problem stresu oksydacyjnego stojący często u podstaw omawianych procesów, a część doświadczeń zmierzała do określenia jego znaczenia, nie został we wstępie odpowiednio naświetlony?

Mgr Jedynak dopracował i zastosował bardzo różnorodne metody pozwalające na określenie parametrów fizjologicznych i analiz molekularnych na wybranym materiale badawczym, co umożliwiło Mu wszechstronne podejście do zagadnienia. W rozdziale *Materiały i Metody* znajdujemy szczegółowy opis postępowania w trakcie przygotowania materiału, oznaczenia zawartości barwników, poziomu reaktywnych form tlenu i ekspresji wybranych genów. Opis poszczególnych technik jest szczegółowy, umożliwiający ich powtórzenie i często wchodzi w detale laboratoryjne jak to zazwyczaj bywa opisywane w pracach cenzusowych. Metodyka pracy jest właściwie dobrana, a szczegóły techniczne

opisane w pracy wskazują na fakt, że Autor świetnie zdaje sobie sprawę z wielu zagrożeń, próbuje je wyeliminować i uniknąć uzyskiwanie artefaktów.

W części eksperymentalnej opisanej w *Wynikach* Doktorant może pochwalić się całym szeregiem imponujących osiągnięć, daleko wykraczających poza standardowe wymagania stawiane doktorantom. Wszystkie pomysłowo przeprowadzone i zróżnicowane serie doświadczalne zaowocowały dużą ilością wyników, umożliwiły wyciągnięcie wielu wniosków i dokonanie uogólnień. Różnorodność podejścia eksperymentalnego pozwala na szeroką i odważną dyskusję. Badania wykonano z zastosowaniem typu dzikiego *A. thaliana* i szeregu mutantów a to: *cop1-4, cop1-6, fus6, fus5, fus6* i *cop9*. Metodami spektrofotometrycznymi, fluorescencyjnymi i mikroskopowymi dokonano analizy poziomu szeregu barwników fotosyntetycznych i ich prekursorów oraz ich lokalizacji w tkankach, a także transkryptów kluczowych genów u wybranych mutantów i u typu dzikiego w różnych fazach rozwoju. Oceniono także możliwość występowania stresu oksydacyjnego w trakcie de-etiolacji na podstawie poziomu tlenu singletowego, poziomu nadtlenku wodoru i natężenia peroksydacji lipidów. Przeprowadzono wstępną analizę zmian dokonującą się w trakcie naświetlania światłem o różnej intensywności.

W rozdziale *Dyskusja* przeanalizowano uzyskane wyniki na tle licznych prac z podobnego zakresu. Należy jednak zauważyć, że badań wykonanych na podobnym materiale, analizujących omawiany problem, o podobnej wnikliwości, jest niewiele. W tej części pracy Autor wykazał się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów, unikając nadinterpretacji. *Dyskusja* dostarcza czytelnikowi dużej porcji informacji i jest rzeczowa, a może nawet zbyt skondensowana. Dysponując tak bogatym materiałem dowodowym szczegółowa analiza tych wyników nie była łatwa do przeprowadzenia. Dane te i dane literaturowe pozwoliły na zaproponowanie wielu koncepcji wzajemnych oddziaływań szeregu procesów fizjologicznych, które były już wielokrotnie zauważane, ale których wyjaśnienie nie było możliwe. Uzyskane wyniki sprawdzono we wzajemnie potwierdzających się w eksperymentach z zastosowaniem metod o różnym poziomie dogłębności od obserwacji makro- i mikroskopowych po biochemiczne i molekularne. W moim przekonaniu samo zebranie faktów, które stanowią silny dowód znaczenia i roli tych białek w procesie de-etiolacji, jest niezwykle istotnym osiągnięciem rozprawy. Obserwacje te wprowadzają do literatury wyjaśnienia dotyczące powiązań tych białek z innymi procesami fizjologicznymi. Przedstawione badania umożliwiają w wielu przypadkach jednoznaczną interpretację wyników innych badań, które napotykały dotychczas na trudności

interpretacyjne. Z dużym prawdopodobieństwem można sądzić, że wykonane prace będą inspiracją do dalszych badań.

Wybrane białka kompleksu sygnałowego COP9 mają swoje odpowiedniki w organizmach zwierzęcych, a zatem można przypuszczać, że wykształciły się na wczesnych etapach ewolucji i przejęły funkcje regulacyjne w opisywanych procesach de-etiolacji. Białka kompleksu COP/DET/FUS biorą udział w determinacji specyficzności sygnałowej i zajmują centralną pozycję metaboliczną. Białko COP1 wpływa na regulację cyklu ksantofilowego, a zatem ma udział w niefotochemicznym procesie rozpraszania energii w PSII. Powiązania tych białek z systemem kontroli biosyntezy karotenoidów tkanek rosnących w ciemności wskazuje na zabezpieczenie organizmów w czasie de-etiolacji. Skomplikowana regulacja syntezy chlorofilu wynika z konieczności budowania aparatu fotosyntetycznego a równocześnie ochrony przed nadmiarem RFT i stresem oksydacyjnym. Autor wykazał także, że białko COP1 jest zaangażowane w kształtowanie odpowiedniego stosunku chla/chlb, ale w dyskusji nie wspomniano, że stosunek chla/chb to równocześnie kluczowy element decydujący o relacji pomiędzy aktywnością PSII/PSI. Trudno sobie wyobrazić, żeby właśnie ten wskaźnik nie miał znaczenia przy kształtowaniu aparatu fotosyntetycznego. To właśnie z tych zależności wynika nasilenie fotoinhibicji, o której wspomina Autor. Podobna uwaga tyczy się również rozważań dotyczących relacji pomiędzy zawartością chlorofilów i karotenoidów. Z zagadnieniem fotoinhibicji związana jest również peroksydacja lipidów przedstawiana w pracy, która zapewne jest zależna od produkcji i tempa zmiatania RFT. W ramach dyskusji wyników zwrócono uwagę na fakt braku intensyfikacji produkcji RFT w następstwie oświetlenia. Już tylko ta obserwacja może sugerować, że produkcja RFT jest rezultatem procesów niezależnych od światła. Zauważając te pozorne sprzeczności należałoby problem produkcji RFT nie rozpatrywać tylko w kontekście stresu oksydacyjnego jak czynnika szkodliwego, ale w kontekście produkcji sygnału uruchamiającego inne procesy. Aż trudno sobie wyobrazić, aby siewki nie korzystały z tych ścieżek sygnałowych funkcjonujących w innych tkankach i to nie tylko tkankach roślinnych. Kontynuując moje rady przy dalszym udoskonalaniu dyskusji wyników widziałbym też naświetlenie problematyki reorganizacji ciała prolamelarnego plastydów w chloroplasty i formowaniu tylakoidów i gran jako kluczowego procesu związanego z procesem de-etiolacji. Przy okazji chciałbym zaznaczyć, że opisane zmiany w składzie barwników fotosyntetycznych w trakcie de-etiolacji niejednokrotnie idą w identycznym kierunku jak zmiany adaptacyjne do zmieniającego się oświetlenia, jak też przy porównaniach różnie naświetlonych tkanek zielonych. Zatem można się spodziewać, że rola opisywanych białek będzie znacznie szersza

niż tylko tych opisywanych w trakcie zazieleniania siewek. Moje uwagi stanowiące w dużej części pochwały i komplementy w oczywisty sposób nie ujmują wartości merytorycznej pracy i stanowią jedynie rady określające kierunek sugerowanych zmian przy dalszym opracowywaniu tekstu.

Przy ogromie wykonanych prac doświadczalnych dyskusja wyników ujawniła, jak ambitnym zadaniem jest powiązanie obserwacji fizjologicznych z analizą ekspresji genów. W wielu przypadkach luki w naszej wiedzy dotyczące roli wielu białek zostały doprecyzowane. Uzyskane wyniki mogą być jeszcze eksploatowane i to niekoniecznie w analizie wybranego materiału roślinnego i czynników stresowych. Duże fragmenty pracy mają charakter manuskryptu w formie przygotowanej do druku. Wyniki i rezultaty są przedstawione w sposób bardzo skondensowany. Doktorant jest współautorem prac oryginalnych i najwyraźniej zdobył już pewne doświadczenie, które pomogło Mu w pisaniu pracy doktorskiej. Praca jest napisana zwięzłym, treściwym i poprawnym językiem, co bardzo ułatwia lekturę. Należy też zauważyć bardzo staranną redakcję pracy przy minimalnej ilości tzw. literówek. Jedyna uwaga do strony redakcyjnej dotyczy opisu szeregu rycin jak np. Rys.4.10-4.13 , który jest nieco mylący. W wymowie ogólnej pokazują one faktycznie różnice, ale wykresy pokazują zawartości transkryptów, na podstawie których możemy wyliczyć różnice.

Opisane powyżej uwagi dotyczące ocenianej pracy skłaniają mnie do sformułowania następujących pytań pod adresem Doktoranta:

1. Znaczna część dyskusji toczy się wokół problemów ekspresji genów w zależności od fazy rozwojowej siewki. Wyniki badań wskazują, że niektóre z badanych białek, które wykazują zmieniony poziom ekspresji skutkują dużymi modyfikacjami w rozwoju rośliny. W jakim stopniu na podstawie przedstawionych wyników można spekulować na temat różnic w rozwoju roślin nago – i okrytonasiennych?

2.Czy na obecnym etapie badań można sobie wyobrazić ewolucję tego skomplikowanego mechanizmu?

Podsumowanie:

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich i spełnia wszelkie wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Autor wykazał się dużą wiedzą teoretyczną, znajomością nowoczesnych technik, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. Ponadto wypracował szereg cennych szczegółów metodycznych oraz wykonał ogromną ilość

badań, które stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących formowania aparatu fotosyntetycznego i bez wątpienia będą w przyszłości eksploatowane także przez badaczy zajmujących się innymi roślinami. W związku z tym z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgra Pawła Jedynaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego i proponuję rozważenie wyróżnienia pracy.



/-/ Zbigniew Miszalski