

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. RAFAŁA KRELI

**Tytuł rozprawy: Molekularna i funkcjonalna
charakterystyka nukleaz
zaangażowanych w programowaną
śmierć komórki u roślin**

Promotor: dr hab. Krzysztof Leśniewicz

Programowana śmierć komórki często określana od angielskiego skrótu Programmed Cell Death, jako PCD to naturalny, zaprogramowany genetycznie proces. Może do niego dochodzić w trakcie rozwoju organizmu ale także w odpowiedzi na niektóre czynniki środowiskowe. Polega on na aktywnej eliminacji składników komórki i prowadzi do jej śmierci. Poszczególne typy zamierania różnią się jednak pod względem czynników je wywołujących, a także symptomów, przebiegu i objawów. Proces ten występuje powszechnie u roślin i zwierząt, wykazując daleko idące podobieństwo, należy jednak podkreślić, iż mimo dużych analogiczności proces PCD u roślin przebiega w odmienny sposób niż u zwierząt. Odmienna jest również w dużym stopniu jego biologiczna funkcja. PCD niesie ze sobą istotne znaczenie wynikające z roli jaką pełni m.in. w redystrybucji cennych składników budulcowych odzyskiwanych z komórek podlegających eliminacji. Przykładem takiego scenariusza jest np. występująca powszechnie zarówno u roślin, jak i grzybów autofagia. Proces ten polega na trawieniu przez komórkę jej własnych struktur. Ta śmierć komórkowa występuje przy niedoborze składników pokarmowych i często degradacja struktur w jednej komórce zachodzi po to, by produkty jej rozpadu wzięły udział w syntezie składników innych komórek organizmu. PCD u roślin warunkuje także m.in. prawidłowe formowanie zarodka podczas embriogenezy i odgrywa ważną rolę, w regulacji histogenezy, np. w przypadku aerenchymy oraz członów naczyń ksylemu. Zamieranie komórek ma również swój udział w formowaniu organów jak i w starzeniu oraz obumieraniu fragmentów roślin.

Jednym z podstawowych zjawisk towarzyszących PCD w komórce jest degradacja zawartych w niej kwasów nukleinowych, a do charakterystycznych objawów PCD należy m.in. fragmentacja chromatyny oraz degradacja jądra komórkowego. U roślin degradacji tej towarzyszy pojawienie się aktywności co najmniej kilku nukleaz charakteryzujących się różnymi właściwościami katalitycznymi. Przyjmuje się, że w trakcie procesu PCD w

hydrolizie DNA współuczestniczą ze sobą nukleazy należące do rodziny S1/P1 wraz z nukleazami należącymi do innych rodzin, np. S_{NC}. Ponieważ enzymy te posiadają zróżnicowane wymagania katalityczne, teoretycznie mogą one pełnić swoje funkcje na różnych etapach PCD, charakteryzujących się różnymi warunkami fizjologicznymi (np. pH, obecność różnych kofaktorów).

Głównym celem przedstawionej do recenzji pracy była próba potwierdzenia założeń teoretycznych dotyczących współudziału różnych nukleaz w mechanizmie degradacji DNA. Przeprowadzone badania wykazały także, w jaki sposób proces ewolucji w wyniku mutacji pozycji aminokwasowych centrum katalitycznego, może prowadzić do wytworzenia różnorodności wymagań katalitycznych wśród nukleaz S1/P1. Opisano również zmiany ich lokalizacji komórkowej w trakcie postępującego procesu PCD w różnych scenariuszach. Pokazano profile ekspresji poszczególnych nukleaz z rodzin S1/P1 oraz S_{NC} *Arabidopsis thaliana* na różnych etapach rozwoju tej rośliny. Pozwoliło to np. na wykazanie, że mechanizmy degradacji DNA angażują różne nukleazy współdziałające ze sobą w trakcie PCD. Przeprowadzone analizy fenotypowe roślin z mutacjami insercyjnymi w genach nukleaz z obu wyżej wspomnianych rodzin białkowych potwierdziły, że kluczowe dla przebiegu procesu PCD u roślin są nukleazy wymagające neutralnego pH oraz obecności jonów Ca²⁺. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, udało się w znacznym stopniu poszerzyć wiedzę na temat zaangażowania i mechanizmu działania różnych nukleaz degradujących w procesie programowanej śmierci komórki.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją poza technicznymi informacjami (spis treści) streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty w sposób zwarty i rzeczowy opisują założenia, sposób realizacji oraz znaczenie badań. Wstęp szczegółowo i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia, takie jak: proces programowanej śmierci komórki, jej molekularny mechanizm czy model udziału w nim nukleaz. Ta część tekstu uzupełniona jest poglądowymi ilustracjami oraz schematami (str. 18, 20, 21, 24). Następny rozdział to cel pracy z podziałem na zadania cząstkowe. Kolejne sekcje to: materiały i metody oraz wyniki i dyskusja. Całość zamyka jednostronicowe podsumowanie, z wypunktowanymi wnioskami oraz bibliografia. Do pracy dołączono wersję elektroniczną.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest oszczędnie, z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Tekst zawiera sporo skrótów. Niektóre z nich są rozwijane inne nie. Niekiedy rozwinięcia są wielokrotnie powtarzane np. VND6 i VND7 (ang. VASCULAR NAC DOMAIN) str. 13,14, czasem są one nieoczywiste np. opadanie jako (ang. abscission) str. 13 czy Programowana śmierć komórki (PCD) str. 7. Myślę, że dobrym zabiegiem edytorskim byłoby zadbanie np. o wykaz skrótów. Nie ma rażących błędów stylistycznych. Autor czasem dość swobodnie posługuje się żargonem pisząc np. „Krażki torfowe poddawano spęcznieniu..” str. 29, „Selekcja pozytywnych kolonii bakteryjnych” str. 35 czy „prążek o właściwej wielkości oczyszczano.” str. 42. Trafne wykorzystanie ilustracji we wstępie choć np. Ryc. 1 mogłaby być w całości w języku polskim. Niezrozumiały jest zabieg zostawienia na rycinie opisów w języku angielskim i tłumaczenie ich w legendzie. W sekcji wyniki uzasadniona jest informacja o grupowaniu ENDO3-5 w jednym klastrze ale przywoływanie Ryc. 29 w tym momencie wprowadza trochę zamieszania, tym bardziej, że jej znaczenie/forma jest ważna dalej w tekście (rozdział 4.3). W rozdziale 7.1.1 sekcji materiały i metody opis składowej Matryca mógłby być uzupełniony np. określeniem - odpowiednio do potrzeb. Drobne literówki np. „Główną funkcją trichom..” str. 14, „Właściwości katalityczne oby tych białek..” str. 25, „..w wyniku dodanie jonów..” str. 48, „...proces degradacja DNA podczas PCD roślin angażuje..” str. 98. Brak kursywy w odniesieniu do nazw gatunków str. 34. Trudne w interpretacji jest oznaczenie ilości aminokwasów w rzędach zestawionych ze sobą nukleaz na Ryc. 12. Do czego odnosi się wartość 29 przy wszystkich? Warta podkreślenia jest dbałość o jakość fotografii. Są one wartościowym dodatkiem do pracy także w sensie estetycznym. Całość rozprawy to 113 stron tekstu (jedna 99 jest zdublowana), 52 ryciny, 13 tabel oraz 145 cytowanych publikacji.

Ocena merytoryczna rozprawy

W pracy doktorskiej pana Rafała Kreli wyodrębnić można siedem zasadniczych części. Otwiera ją zwięzłe, ale dobrze zbalansowane i kompletne streszczenie. Skupia się ono bardzo krótko na definicji PCD, roli kinaz w tym procesie jak i pewnych założeniach co do jego przebiegu wynikających z ich różnych właściwości. Kolejny rozdział to wstęp. To w nim Autor rozwija definicję procesu programowanej śmierci komórki, skupiając się głównie na roli tego procesu podczas rozwoju roślin (5 stron) i w mniejszym stopniu (zaledwie ½ strony) na samobójczej śmierci komórek indukowanej jako mechanizm obronny. Ta ostatnia to głównie kontekst reakcji nadwrażliwości (ang. hypersensitive response, HR), w wyniku



infekcji komórki przez wirusy, bakterie. Mniej jest o np. PCD wywołanej przez nekrotroficzne patogeny dla których obumieranie komórek gospodarza jest korzystne, gdyż odżywiają się one ich składnikami. Bardzo dobrze natomiast są rozwinięte opisy molekularnych mechanizmów programowanej śmierci komórki zarówno rozwojowej jak i środowiskowej. Zawierają one informacje o każdym ich etapie, zaangażowanych czynnikach transkrypcyjnych, kaskadach sygnałowych oraz skutkach. W dalszych częściach wstępu Autor szczególny nacisk kładzie na opis nukleaz typu S1/P1 oraz SnC. Jest w nim aspekt historyczny (nukleaza P1 *Penicillium citrinum*) ważny dla zrozumienia mechanizmu katalizy, oraz obecny stan wiedzy o nukleazach roślinnych. Autor ciekawie buduje w nim w oparciu o m.in. historie doświadczeń różnych zespołów w identyfikacji/określeniu właściwości katalitycznych nukleaz S1/P1 u *Arabidopsis* dalszą potrzebę rozwikłania wymagań katalitycznych dla tych białek. Zaskakujący jest mimo wszystko kontekst stosunkowo starych cytowań dotyczących badań nad ich strukturą. Kolejna część rozprawy to cel pracy. Tutaj zabrakło precyzji. Po tak skonstruowanym wstępie dodatkowy opis dlaczego chce się pewne rzeczy robić jest niepotrzebny. Wystarczy opisać co chciałoby się osiągnąć. Myślę też, że punkty 3-5 można by było spiąć jednym słowem kluczowym analiza funkcji w oparciu o wzór ekspresji, lokalizację oraz badania fenotypowe mutantów.

Dalszą część rozprawy stanowi opis materiałów i metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to 18 stron. W dużej mierze opis ten dotyczy klonowań różnych wariantów badanych białek, transformacji mikroorganizmów oraz materiału roślinnego, a także specjalistycznych testów jak zymografia oraz parametrów obrazowania.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki. Wybór organizmów do proponowanych badań wydaje się bardzo arbitralny. Zaskakujący trochę jest fakt mocnego zaakcentowania *Acanthamoeba castellanii* a pominięcia np. przy analizach porównawczych Ryc. 7 czy Ryc. 10 innych modelowych roślin chociażby takich jak *Oryza sativa* czy *Medicago truncatula* reprezentujących różne ewolucyjnie strategie rozwojowe/adaptacyjne. Te ostatnie odzwierciedlone np. poprzez amplifikacje genów kodujących nukleazy S1 u *Medicago*. Poprosiłbym o dodatkową argumentację takiej decyzji. W podrozdziałach 1.1-1.2 Autor bada wymagania katalityczne nukleaz S1/P1 z mszaka *Physcomitrella patens* oraz pełzaka *Acanthamoeba castellanii*. To całkowicie nowe wyniki. Pokazują różnice w aktywności, zarówno w różnych pH jak i obecności jonów metali. W ich kontekście chciałbym zapytać o rozróżnienie pomiędzy pojęciami osłabienie aktywności a inhibicja. Czy osłabienie wynika tylko z kompetycji o

miejsce aktywne w warunkach reakcji czy może zależy także od właściwości/roli kofaktora? Jak należy interpretować zdanie „W mniejszym stopniu aktywność tej nukleazy przywracała obecności Ca^{2+} „ (str. 48) dotyczące PpNuc1 oraz Ryc. 8B. Z ryciny tej nie można wywnioskować o przywracaniu aktywności. Ciekawe obserwacje dotyczą AcNuc1 i AcNuc2. Zwłaszcza braku efektu EDTA użytego do wiązania metali dwuwartościowych na aktywność AcNuc1. Rodzi to naturalnie pytanie o potencjalne przyczyny tej obserwacji ale wyjaśnienia wymaga przede wszystkim dość zawiły tekst będący następstwem eksperymentów z EDTA: „Test ten wykazał jednak, że aktywność AcNuc2 ulega inhibicji w wyniku dodania jonów Mn^{2+} i Ca^{2+} do białek poddanych uprzednio działaniu EDTA. Z tego powodu do identyfikacji jonów aktywujących AcNuc2 posłużono się białkami poddanymi inaktywacji przy użyciu EDTA oraz Ca^{2+} . Jak widać na (Ryc. 9C) w tych warunkach dodanie jonów Zn^{2+} w pełni reaktywuje aktywność białka AcNuc1.” Nie do końca ma on odzwierciedlenie w rycinach do których się odwołuje. W podrozdziale 2 wyników Autor pochyla się nad motywami aminokwasowymi centrum aktywnego nukleaz S1/P1. Przeprowadza analizy podobieństw szeregu białek z ich podziałem na dwa klady o różnym grupowaniu na różnych chromosomach i różnych wymaganiach katalitycznych. Analizując cztery domeny budujące centrum katalityczne tych enzymów znajduje różnice pomiędzy nukleazami różnych grup katalitycznych w II domenie a przeprowadzone punktowe mutacje w wybranych pozycjach zmieniają ich aktywność katalityczną. Ciekawi mnie jak Autor skomentuje efekt zaobserwowany dla ENDO4 po zamianie H49/K tj. nabycie aktywacji w obecności jonów Zn^{2+} i utrzymanie dotychczasowej w obecności jonów Ca^{2+} (Ryc. 13). Kolejne podrozdziały to obserwacje lokalizacji i jej zmian dla badanych nukleaz w trakcie procesu starzenia, PCD oraz działania kwasu salicylowego z wykorzystaniem heterologicznej ekspresji w liniach tytoniu BY2. Lokalizacja komórkowa w różnych scenariuszach wyraźnie pokazuje, że poszczególne nukleazy S1/P1 lokują w zróżnicowanych fizjologicznych przedziałach komórkowych korelujących z ich wymaganiami katalitycznymi, jednocześnie najbardziej różnorodna katalitycznie ENDO2 wykazuje szerokie spektrum obecności co umożliwia jej hydrolizę DNA w różnych warunkach fizjologicznych. Warto także podkreślić, iż czynniki zewnętrzne takie jak np. kwas salicylowy, wpływają na transport niektórych nukleaz w obrębie komórki. W dalszej części pracy Autor ilustruje badania nad aktywnością promotorów genów poszczególnych nukleaz z wykorzystaniem genu reporterowego GUS u *A. thaliana*. To obszerny (22 strony) i ważny fragment rozprawy, który próbuje odpowiedzieć na pytanie w jakim stopniu poszczególne nukleazy z rodziny S1/P1 współdziałają/są współobecne podczas PCD. Z sześciu badanych nukleaz udało się określić profile ekspresji dla pięciu z nich. Jak

pokazano, każda z nukleaz posiada specyficzny dla siebie wzór ekspresji. Profile te pokrywają się jednak w przypadku niektórych tkanek. Autor analizuje je, co uzasadnione, w tych częściach roślin w których przebiegają różne typy PCD. W korzeniu np. koreluje ekspresję nukleazy ENDO3 i ENDO5 z rozwojem tkanek przewodzących. Te dwie nukleazy wraz z CAN1 z rodziny S_{Nc} także ulegają silnej koekspresji w komórkach budujące czapczkę korzenia. Liczne przykłady ekspresji nukleaz z rodzin S1/P1 oraz S_{Nc} obserwowano także na różnych etapach rozwoju kwiatów oraz w powstających łuszczykach. W kontekście tej pracy uwagę w tych organach zwracają trzy nukleazy ENDO2, ENDO3 i CAN1 występujące w obszarze pylników. Ekspresję ich można powiązać z dobrze opisanym procesem PCD jaki zachodzi w tapetum pylnika. Szczególnym przykładem organów podlegającym starzeniu są liścienie i liście. Z przeprowadzonych badań wynika, że w liścieniach *A. thaliana* dochodzi do ekspresji aż pięciu nukleaz ENDO2, ENDO3, ENDO5, CAN1 oraz CAN2. Z kolei w liściach w organie o wysokiej redystrybucji składników budulcowych, która następuje w efekcie ich starzenia oprócz opisanej dotychczas ENDO1 znaleziono także ENDO3, ENDO5 oraz CAN1. Z uwagi na fakt, iż nukleazy S1/P1 u poznanych gatunków roślin i ameb występują w rodzinach wielogenowych, chciałbym poznać pana opinię dotyczącą nie tylko ich plastyczności katalitycznej ale także potencjalnej redundancji funkcjonalności. Analizę ekspresji uzupełniają przeprowadzone badania fenotypowe mutantów pozbawionych poszczególnych nukleaz. Zaskakująco mało wyraziste wyniki jak na enzymy uczestniczące w programowanej śmierci. Właściwie tylko rośliny ze zniesioną ekspresją nukleaz ENDO1 i CAN1 charakteryzowały się mniejszą powierzchnią liści niż rośliny typu dzikiego. Ciekawi mnie pomysł Autora na rozwinięcie tych badań eksperymentalnych w dedykowany sposób, aby uwypuklić znaczenie poszczególnych nukleaz czy też potencjalne interakcje między nimi.

Rozprawę zamyka rozdział dyskusja i krótkie podsumowanie. Dyskusja jest rozdziałem zwartym, nie „przegadany”, bardzo dobrze uzupełniającym całość dysertacji. Zawiera informacje o niemalże każdym aspekcie pracy (może z wyjątkiem badań dedykowanych wymaganiom katalitycznym - a szkoda bo te są intrygujące). Nie jest to jednak tylko opis. Autor wysuwa hipotezy np. dotyczące szczególnej roli ENDO1 i CAN1 w hydrolizie kwasów nukleinowych pochodzących z komórek podlegających PCD w liściach jako źródła takich pierwiastków jak azot czy fosfor, których niedobór ogranicza możliwości wzrostu czy też aktywności niektórych z nich w tkankach niepodlegających PCD. Co więcej odnosi się do trudnych w interpretacji wyników np. ENDO2 lokalizującej w jądrze komórkowym a także proponuje dalsze badania w innych warunkach eksperymentalnych.

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autor jest sprawnym badaczem posiadającym ugruntowaną wiedzę. Uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Rafała Kreli do dalszych etapów przewodu.

Poznań 30.11.2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rafał Krel', written in a cursive style.